



HAL
open science

Cryoconservation d'embryons bovins produits in vitro et biopsiés

Sarah Janati Idrissi

► **To cite this version:**

Sarah Janati Idrissi. Cryoconservation d'embryons bovins produits in vitro et biopsiés. Biologie de la reproduction. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1020 . tel-03945737

HAL Id: tel-03945737

<https://theses.hal.science/tel-03945737>

Submitted on 18 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre : 2022LYSE1020

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé (EDISS)

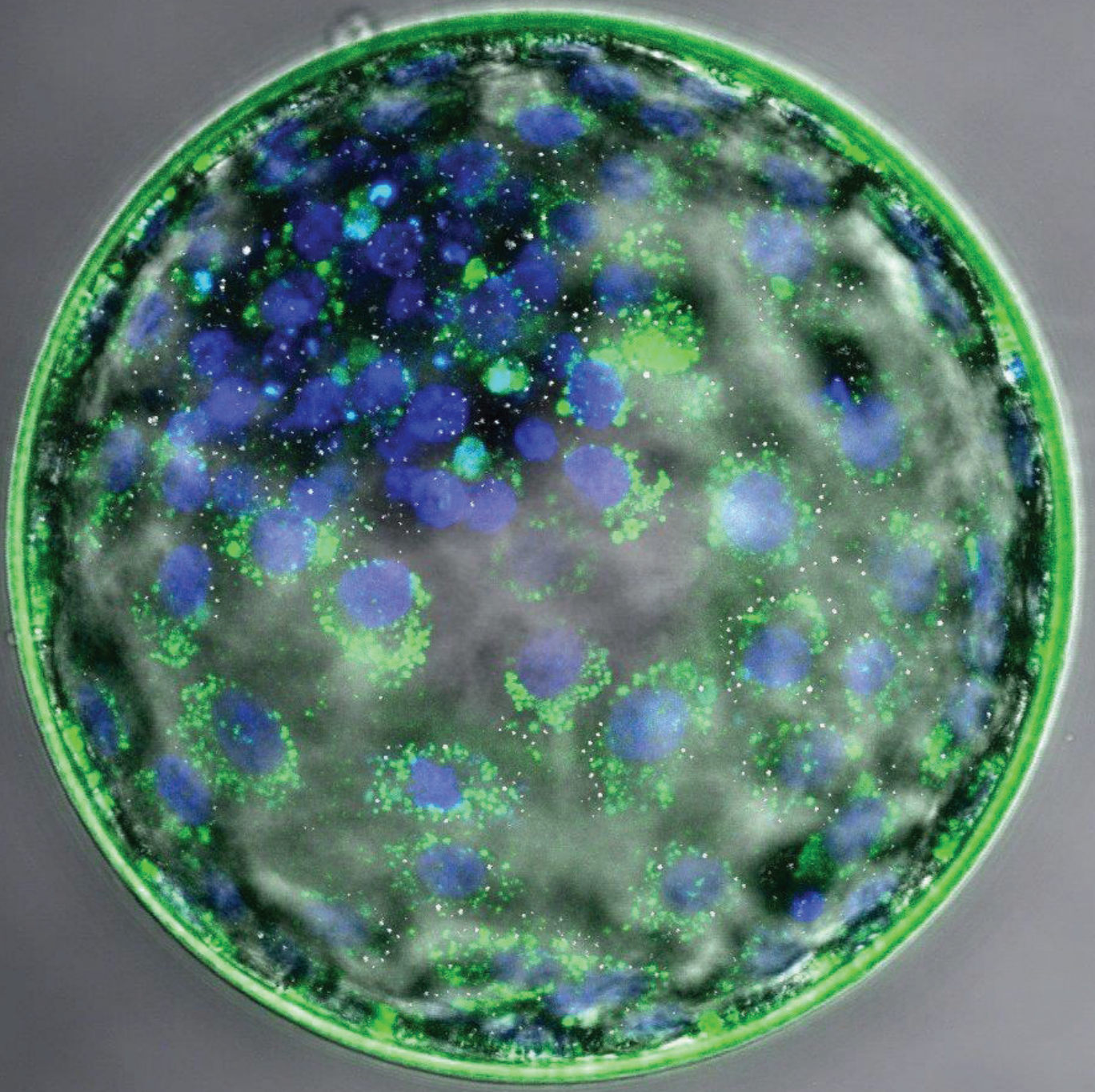
Spécialité de doctorat :
Discipline : BIOTECHNOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Soutenue publiquement le 16/02/2022, par :
Sarah JANATI IDRISSI

Cryoconservation d'embryons bovins produits *in vitro* et biopsiés

Devant le jury composé de :

David Laurent	Professeur des Universités, Université de Lyon 1 UMR 5223 IMP	Président de jury
Labbe Catherine	Directrice de Recherche, INRAE Rennes UR 1037 LPGP	Rapporteur
Mermillod Pascal	Ingénieur de Recherche, INRAE Tours UMR 7247 PRC	Rapporteur
Chavatte-Palmer Pascale	Directrice de Recherche INRAE Jouy en Josas UMR 1198 BREED	Examinatrice
Chastant-Maillard Sylvie	Professeur des écoles Nationales Vétérinaires, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	Examinatrice
Buff Samuel	Professeur des écoles Nationales Vétérinaires, VetAgro Sup ICE	Directeur de thèse
Joly Thierry	Directeur de Recherche, ISARA Lyon, ICE	Co-directeur de thèse
Elis Sébastien	Directeur de Recherche, INRAE Tours UMR 7247 PRC	Invité
Schibler Laurent	Responsable Développement et Innovation ; Allice Paris	Invité



Cryoconservation des embryons bovins produits *in vitro* et biopsiés

Sarah Janati Idrissi

Université Claude Bernard Lyon 1
Thèse de Doctorat n° : 2022LYSE1020



VetAgro Sup



Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Pierre ROLLAND	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique		M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration		M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER	
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU	
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND	

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Titre : Cryoconservation d'embryons bovins produits *in vitro* et biopsiés

Résumé

Aujourd'hui la cryoconservation de l'embryon bovin est primordiale pour assurer sa préservation dans l'attente de sa valorisation. Cependant, la qualité des embryons produits *in vitro* est inférieure à celle de ceux produits *in vivo* ne permettant pas l'obtention de taux de gestation équivalents. Lors du processus de congélation, les membranes, majoritairement composées de lipides, subissent des contraintes physiques et chimiques pouvant aboutir à une lyse des cellules embryonnaires. Ainsi, afin d'améliorer la qualité des embryons bovins produits *in vitro* et biopsiés, deux tâches ont été menées en parallèle : (1) l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques sur le profil lipidique des embryons produits *in vitro* et la modulation de ce profil par l'ajout d'acides gras de type oméga 3 avec pour objectifs d'augmenter la fluidité membranaire et de diminuer la cryosensibilité des embryons; (2) l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques sur l'intérêt du CRYO3, dans la formulation de milieux de cryoconservation synthétiques, pour la cryoconservation des embryons bovins. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que le profil lipidique des embryons est fortement impacté par le processus de production *in vitro* et les protocoles de cryoconservation. La modulation du profil lipidique par l'ajout d'oméga 3 n'impacte pas le développement et la cryosurvie des embryons mais semble bénéfique à l'obtention d'embryons de meilleure qualité. Enfin, le CRYO3 est un candidat intéressant permettant de se passer des milieux habituels, contenant des dérivés de produits animaux, tout en améliorant la cryosurvie des embryons.

Mots clés : Profil lipidique, embryons, cryoconservation, culture *in vitro*, biopsie, bovin

Title: Cryopreservation of bovine embryos *in vitro* produced and biopsied

Abstract

Today, cryopreservation of bovine embryo is essential to ensure its preservation while awaiting their valuation. However, the quality of the *in vitro* produced embryos is inferior to those produced *in vivo*, resulting in different gestation rates. During the freezing process, the membranes, mainly composed of lipids, undergo physical and chemical stress which can lead to lysis of embryonic cells. In this way, in order to improve the quality of *in vitro* produced bovine embryos, with the ambition to increase the pregnancy rate after transfer, two tasks were carried out in parallel: (1) The acquisition of new scientific knowledge on the lipid profile of *in vitro* produced bovine embryos and the modulation of the lipid profile by the addition of omega 3 fatty acid with the objectives of increasing membrane fluidity and reducing the embryo cryosensitivity; (2) the acquisition of new scientific knowledge on the interest of CRYO3, in the formulation of synthetic media for the cryopreservation of *in vitro* produced and biopsied bovine embryos. This work has demonstrated that the lipid profile of embryos is strongly impacted by the *in vitro* development and cryopreservation protocol. Modulating the lipid profile by adding omega 3 does not impact the development and cryosurvival of embryos but appears to be beneficial for improving embryonic quality. Finally, CRYO3 is an interesting candidate, making it possible to dispense with the usual media, containing derivatives of animal products, while improving the cryosurvival of the embryos.

Keywords: Lipid profile, embryos, cryopreservation, *in vitro* culture, biopsy, cattle

Adresse du laboratoire :

Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP ICE 2021.A104, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de soutenance et particulièrement Laurent David pour m'avoir fait l'honneur d'en assurer la présidence.

Je souhaite également assurer à Catherine Labbé et Pascal Mermillod mes sincères remerciements pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse et pour m'avoir fait bénéficier de votre expertise.

Enfin je souhaite exprimer toute ma gratitude à Sylvie Chastant-Maillard et Pascale Chavatte-Palmer dont la présence au sein du jury est un honneur.

Je souhaite sincèrement remercier Samuel Buff pour avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Merci pour tes conseils et les échanges que l'on a pu avoir. Merci pour ta confiance et ta disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse.

Je souhaite tout particulièrement remercier Thierry Joly, co-encadrant de cette thèse. Merci Thierry pour tous les moments échangés ! Merci de nous avoir accueillis à Lyon dans la cabane au fond de ton jardin (ça fait un peu glauque écrit comme ça). Merci de m'avoir formée à la vitrification et de m'avoir emmenée sur le terrain pour congeler et vitrifier des embryons de lapins. Cependant je ne te remercie pas pour les tomates farcies pas cuites, heureusement qu'il y avait de la chartreuse (VEP). Merci pour tous tes encouragements, comme tu me l'as tant dit « lâche rien et garde ton sourire » !! La bise, on se recroisera sûrement en Bretagne autour d'une bolée de cidre !

Je souhaite remercier l'ensemble de mes collègues de la société Alice avec qui je partageais mon quotidien et qui l'on rendu agréable.

Un grand merci à Laurent Schibler pour avoir accepté de m'encadrer sur ce contrat de thèse Cifre au sein de la société Alice. Merci pour tous les échanges que l'on a pu avoir et tous les conseils que tu m'as donné que ce soit sur la rédaction ou la préparation de la soutenance.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Pascal Salvetti sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir encadré au quotidien au sein d'Allice et d'avoir relu et corrigé les multiples versions d'articles ou de manuscrit de thèse que je t'ai envoyé. J'espère ne pas t'avoir traumatisé. Un grand merci pour tous les moments de vie partagés depuis 3 ans et pour tout ce que tu m'auras apporté qui m'aura permis d'être là où j'en suis aujourd'hui. Finalement tu étais un peu un papa de thèse, qui m'a aiguillé et encouragé dans les moments difficiles comme dans les meilleurs !

Merci à Olivier Desnoës et Laurène Le Berre pour avoir contribué au bon déroulement de ce projet de thèse. Merci à Olivier d'avoir réalisé les OPU et collectes d'embryons sur nos génisses recrutées pour le projet. Merci à Laurène de s'être occupée au quotidien des animaux et d'avoir fait tant d'allers-retours à l'abattoir pour m'apporter du matériel biologique. Sans vous rien n'aurait été possible. Merci Olivier pour ses quelques footing que l'on aura fait ensemble sur la pause du midi, j'en garde de très bons souvenirs même si tu me disais qu'on allait courir 8km et qu'en réalité il y en avait 10.

Petite dédicace aux 20 000 vaches (merci Samuel pour le calcul) dont les co-produits ont pu être valorisés dans cette thèse.

Merci à Victoria Slezec-Frick, stagiaire M2, que j'ai eu la chance d'encadrer. Merci Victoria pour tout le travail réalisé. Sans toi cette dernière année de thèse aurait été bien différente. Merci pour tous les échanges que l'on a pu avoir qui ont rendu ces 6 mois très agréables ! Je te souhaite une bonne continuation et une grande carrière scientifique !

Merci à Blanche Deloupy-Dobin avec qui je partageais mon « grand bureau ». Merci pour ta bonne humeur et ton énergie qui nous a tous stimulés. Je te souhaite de révolutionner le bien-être animal en élevage, tâche ardue mais que tu prends à bras le corps ! Peut-être qu'un jour tu passeras à la télé ? Je te souhaite le meilleur !

Enfin un grand merci à tous mes autres collègues du site de Nouzilly, merci à Julie, Louison, Léa, Cécile, Nathalie, Thomas et Aurélie. Merci pour votre accueil chaleureux et tous les bons moments échangés. Merci également à tous ceux du site de Jouy en Josas et de Bercy qui ont participé de près ou de loin à la bonne réalisation de ce projet. Merci à Marie-Christine Deloche de m'avoir formée au sexage des embryons et à Daniel Le Bourhis de m'avoir formée à la production *in vitro* d'embryons.

Je souhaite remercier l'ensemble des collègues, de l'INRAe centre-val-de-Loire qui ont participé au bon déroulement de ce projet.

Merci à Sébastien Elis pour m'avoir encadré sur la rédaction des articles de thèse. Merci de m'avoir accordé autant de temps et merci pour tous tes conseils qui m'ont permis de mettre en forme les résultats obtenus lors de cette thèse.

Je tiens également à remercier chaleureusement Marie-Claire Blache et Maryse Meurisse de la plateforme d'imagerie Cellulaire. Merci à toutes les deux de m'avoir formée à la microscopie confocale et de m'avoir prodigué tant de conseils pour la réalisation des protocoles d'immunomarquages. Merci Maryse pour tous les « μ L » d'anticorps que tu m'as gentiment donné. Vous êtes des personnes géniales, je vous souhaite tout le meilleur pour la suite. Maryse on se recroisera peut-être du côté de Sarzeau !

Je souhaite remercier mes collègues du CHU Bretonneau qui ont participé à l'analyse du profil lipidique des embryons

Merci à Patrick Emond d'avoir accepté de collaborer avec nous pour l'analyse du profil lipidique des embryons en spectrométrie de masse et de nous avoir facilité l'accès à la plateforme d'analyse.

Un grand merci à Antoine Lefevre pour m'avoir formée à l'extraction lipidique et à l'analyse des résultats de spectrométrie de masse. Merci d'avoir permis l'analyse du profil lipidique de 165 embryons et pour tout le temps que tu m'as accordé.

Je souhaite remercier mes collègues de l'Université de Paris Descartes qui ont participé à l'analyse des milieux de cryoconservation des embryons au DSC.

Merci à Anne Baudot et Gérard Louis de m'avoir accueilli à Paris et de m'avoir accordé votre temps. Malgré tous les soucis de remise en route de l'appareil, vous avez fait tout votre possible pour que l'analyse des échantillons soit réalisée avant la fin de thèse et ce malgré vos emplois du temps chargés. Gérard, merci pour les madeleines et les fameux sandwiches de cette fameuse boulangerie.

Je souhaite remercier ma famille et mes amis, qui ont participé à mon bien-être durant ces trois années de thèse.

Un grand merci à mes parents qui me soutiennent et m'encouragent depuis toujours et ce qu'importe ce que ça leur coûte. Sans votre aide, mon quotidien aurait été bien différent. Merci à mes frères et sœur pour les bons moments passés que ce soit en Bretagne ou à Paris. C'est un plaisir de vous voir grandir et développer vos petites vies respectives.

Merci à mes ami(e)s, pour tous les bons moments partagés ces dernières années. Merci à Sophie, Lauriane et Pauline. Merci pour votre soutien quotidien, pour les week-ends et soirées passés ensemble, pour les moments difficiles comme les meilleurs. Merci à mes lady boys Morgan, Corentin et Baptiste. Merci d'être toujours là malgré la distance. Je n'ai qu'une hâte c'est de retourner skier avec vous sur les pistes du Dévoluy. Merci à Juliette, Charlotte et Juliette, qui depuis la PACES et malgré la distance me témoignent toujours de leur amitié et avec qui je partage aujourd'hui de très bons moments, à Paris, à Rennes ou ailleurs. Je vous embrasse tous !

Enfin un grand merci à mon chéri Bruno avec qui je partage les meilleurs moments de ma vie depuis 7 ans. Ton soutien quotidien me procure une réelle force. Malgré la distance qui nous sépare, toi à Paris et moi à Tours, tu es resté ; merci d'avoir supporté cette situation. On en aura vécu des choses en 7 ans et après tout ce qu'on a traversé ensemble je pense qu'on est prêts pour pas mal d'épreuves ! Hâte de découvrir ce que la vie nous réserve ! Je t'aime.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	3
Remerciements	5
<i>Table des matières</i>	9
Table des illustrations.....	13
1. Introduction générale	15
Contexte	17
Etude bibliographique	25
<i>Chapitre 1. Comment améliorer la qualité et la congélabilité des embryons bovins produits in vitro et biopsiés ?</i>	25
1. <i>Le gold standard : Développement embryonnaire in vivo de l'ovocyte jusqu'au blastocyste</i>	29
1.1. <i>Maturation in vivo</i>	29
1.2. <i>Fécondation in vivo</i>	31
1.3. <i>Du clivage au blastocyste</i>	33
2. <i>L'embryon produit in vitro</i>	37
2.1. <i>Développement in vitro, ce qui change par rapport au développement in vivo</i>	37
2.2. <i>Qualité de l'embryon produits in vitro</i>	38
3. <i>Quelles pistes d'amélioration du processus de PIV ?</i>	43
3.1. <i>Qualité des ovocytes immatures ponctionnés</i>	43
3.2. <i>Contrôle du stress oxydatif et de l'apoptose</i>	45
3.3. <i>Modulation du profil lipidique</i>	47
<i>Chapitre 2. Comment améliorer l'efficacité des protocoles de cryoconservation?</i>	55
1. <i>Principes cryobiologiques</i>	57
1.1. <i>Changement de phase de l'eau</i>	57
1.2. <i>Cristallisation/nucléation</i>	58
1.3. <i>Vitesse de refroidissement</i>	59
1.4. <i>Effets biologiques de la descente en température</i>	61
1.5. <i>Agents cryoprotecteurs</i>	63
2. <i>Cryoconservation des embryons bovins</i>	67
2.1. <i>Etat de l'art des méthodes de cryopréservation des embryons bovins</i>	67
2.2. <i>Amélioration des protocoles de cryopréservation</i>	71
2. Objectifs de la thèse	75
1. <i>Evaluer et moduler le profil lipidique des embryons produits in vitro</i>	78

1.1.	<i>Evaluer le profil lipidique des embryons produits in vitro</i>	78
1.2.	<i>Evaluer l'impact de la supplémentation des donneuses en omega-3 sur le profil lipidique de l'embryon</i>	79
1.3.	<i>Moduler le profil lipidique des embryons produits in vitro</i>	79
2.	<i>Optimiser les protocoles de cryopréservation des embryons PIV</i>	81
3.	Article 1. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process	83
	Abstract	85
	Introduction	86
	Methods	87
	Results	96
	Discussion	105
	References	111
	Conclusions et perspectives.....	115
4.	Article 2. Effects of the donor factors and freezing protocols on the bovine embryonic lipid profile	117
	Abstract	119
	Introduction	120
	Methods	122
	Results	129
	Discussion	140
5.	Article 3. Effect of the combination of DHA and carnosine on the quality of the in vitro produced bovine embryo	153
	Abstract	155
	Introduction	156
	Results and discussion	164
	Supplementary data	178
	References	179
	Conclusions et perspectives.....	183
6.	Article 4. Benefit of CRYO3 on cryosurvival of in vitro produced bovine embryos, non-biopsied or biopsied, and slow frozen or vitrified.....	185
	Abstract	187
	Introduction	188
	Methods	189
	Results	195
	Discussion	201
	References	205

Conclusions et perspectives.....	208
7. Discussion Générale et perspectives.....	211
La modulation du profil lipidique : une bonne stratégie ?.....	213
L'amélioration des protocoles de cryoconservation : un enjeu ?	223
Qu'aurait-on pu faire d'autre pour améliorer les taux de gestation des embryons PIV biopsiés et cryoconservés ?.....	229
8. Références Bibliographiques.....	235
Résumé	256
Abstract	256

Table des illustrations

Figures :

- Figure 1. Evolution des schémas de sélection, (A) avant et (B) après l'arrivée de la sélection génomique, en bovin laitier. 18
- Figure 2. A. Nombre d'embryons bovins (produits in vivo ou in vitro, ainsi que le total) enregistré au cours de la période 2001-2019. B. Nombre d'embryons bovins produits in vitro au cours de la période 2001-2019 par continent. Tiré du rapport de l'I.E.T.S. 2019. 21
- Figure 3. Code numérique du stade de développement embryonnaire chez les bovins. 1 = embryon non fécondé ou embryon unicellulaire ; 2 = embryon de 2 à 16 cellules ; 3 = morula précoce ; 4-9 = embryon au stade post-compaction (Selon la 4ème édition du manuel de l'I.E.T.S). 25
- Figure 4. Morphologie d'embryons bovins produits in vivo (A-E) ou in vitro (F-J). Les différentes photographies représentent des ovocytes matures (A et F), des embryons au stade 2 cellules (B et G), des embryons au stade 8 cellules (C et H), des morulas (D et I) et des blastocystes (E et J). Tiré de (Rizos et al., 2002). 27
- Figure 5. Schémas du cycle œstral bovin adapté de (Moore and Thatcher, 2006). Après l'oestrus, le follicule ovulé devient corps jaune et va sécréter de la progestérone qui va entraîner un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des hormones LH et FSH. Si l'ovocyte ovulé n'est pas fécondé et n'aboutit pas à une gestation, le corps jaune régresse. Une seconde vague folliculaire va se développer sous l'augmentation des sécrétions de FSH et le retour des sécrétions pulsatiles de LH et ce jusqu'au pic de LH déclenchant l'ovulation suivante... 29
- Figure 6. Projections transzonales. Image d'un ovocyte (O) bovin capturé par microscopie électronique à transmission, entouré de sa zone pellucide (ZP) et de cellules du cumulus (CC). La flèche indique une projection transzonale d'une cellule du cumulus reliant l'ovocyte. 30
- Figure 7. Développement pré-implantatoire bovin inspirée de (Li et al., 2010). 34
- Figure 8. Compaction et divergence de lignage dans l'embryon pré-implantatoire (Dard, 2008). 34
- Figure 9. Acides gras poly insaturés de type oméga 3, 6 et 9. 49
- Figure 10. Biosynthèse des acides gras à longues chaînes de types oméga 3 et oméga 6. Adapté de (Calder, 2012) et (Welch et al., 2010). 50
- Figure 11. Impact de la vitesse de refroidissement sur le taux de survie des cellules après leur décongélation, tiré de (Courbière et al., 2009). 62
- Figure 12. Représentation schématique de la spécification des lignages cellulaires au cours des premiers stades embryonnaires chez les bovins. Répartition en « poivre et sel » de l'épiblaste (rouge) et de l'hypoblaste (jaune) au stade blastocyste (J7), puis restriction de SOX2 à l'épiblaste au stade blastocyste expansé (J9). 218
- Figure 13. Analyse de la mort cellulaire dans un blastocyste bovin expansé produit in vitro. Le marquage au bisbenzimidazole (bleu) permet de visualiser tous les noyaux et le marquage TUNEL (vert) permet de visualiser les structures apoptotiques. Les astérisques rouges marquent les noyaux TUNEL. Certaines structures TUNEL positives condensées peuvent apparaître sous forme de corps apoptotiques plus petits contenant de la chromatine condensée. Les flèches rouges marquent les noyaux en cours de nécrose (structures TUNEL positives avec des bords peu distincts). Une incidence élevée de formes identifiées et reconnaissables de mort cellulaire, ont été identifiées au sein de la masse cellulaire interne (entourée en

<i>rouge) en contraste avec les cellules du trophoctoderme qui ne présentent que très peu de structures apoptotiques (Ramos-Ibeas et al., 2020).</i>	<i>222</i>
<i>Figure 14. Modèle schématique illustrant une possible voie de signalisation activée par l'acide lysophosphatidique durant le développement pré-implantatoire de l'embryon bovin. ATX, autotaxin; IGF2R, insulin-like growth factor 2 receptor; LPA, lysophosphatidic acid; LPAR1-4, lysophosphatidic acid receptors 1-4; OCT4, octamer-binding transcription factor 4; PLA2, phospholipase A2; PLAC8, placenta-specific 8 gene; SOX2, sex-determining region Y-box 2. Tiré de (Boruszewska et al., 2016).....</i>	<i>224</i>
<i>Figure 15. Modèle de différenciation cellulaire en fonction de la position des cellules au sein de l'embryon. Tiré de (Nishioka et al., 2009).</i>	<i>225</i>
<i>Figure 16. Nombre total d'embryons bovins produits in vivo et in vitro (IVP) et transférés à l'état frais ou après congélation. Ces données sont tirées des rapport annuels de l'I.E.T.S de 2009 à 2019 (https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee).</i>	<i>232</i>

Tableaux :

<i>Tableau 1. Listes de protocoles de congélation lente d'embryons bovins PIV couramment utilisés dans la littérature</i>	<i>68</i>
<i>Tableau 2. Listes de protocoles de vitrification d'embryons bovins PIV couramment utilisés dans la littérature</i>	<i>70</i>

1. Introduction générale

Contexte

La reproduction assure la pérennité des espèces animales par le renouvellement des générations mais aussi par l'évolution génétique des populations par les mécanismes de recombinaison, mutation et de sélection, naturelle ou artificielle des individus. Concernant les espèces domestiques, l'Homme a toujours cherché à accoupler les meilleurs reproducteurs pour engendrer une descendance adaptée à ses besoins (lait, viande, force de travail). C'est la naissance de la sélection animale phénotypique qui a connu de fortes évolutions méthodologiques.

Avant l'avènement récent de la sélection utilisant la lecture du génome (sélection génomique), couplée aux algorithmes de prédiction des phénotypes, les mères à taureaux étaient sélectionnées principalement sur les performances de leurs ancêtres (sélection sur ascendance), pour être accouplées avec un père à taureaux sélectionné sur les performances de leur descendance. L'accouplement permettait, dans 50% des cas, la naissance d'un mâle qui pouvait prétendre à entrer en taurellerie. Dès qu'il atteignait la puberté, aux alentours de 18 mois, des prélèvements de semence permettaient la réalisation d'inséminations de testage. En moyenne 5 ans après la naissance de ce taureau, ses premières filles entraient en production laitière. C'est donc entre 5 et 7 ans après sa naissance que son index génétique pouvait être apprécié par les performances de ses filles, soit un intervalle de génération moyen de 63 mois (Scheffers and Weigel, 2012) (Figure 1 A.).

Il fallait alors en moyenne 100 filles pour une caractérisation fiable. Pendant cette phase d'attente, les taureaux étaient entretenus en station d'élevage. A l'issue de cette phase, seuls les meilleurs taureaux étaient conservés et produisaient de nouveau de la semence pour être diffusés à grande échelle. Cette approche était donc extrêmement coûteuse. Ainsi, à cette époque, la sélection génétique ne se faisait que sur la voie mâle. C'était le début d'une utilisation massive de l'insémination animale (IA) comme mode de diffusion du progrès génétique.

La meilleure connaissance du génome bovin et des analyses ADN a permis, à partir de 2010, la mise en place d'une analyse du polymorphisme du génome à l'aide de puces de génotypage, permettant l'analyse de plusieurs milliers de SNP (Single Nucleotide polymorphisme, ou polymorphisme d'une base). Ces SNP peuvent être en déséquilibre de liaison avec les gènes impliqués dans les caractères d'intérêts, rendant alors possible l'estimation des effets de chacun de ces SNP sur les caractères

d'intérêt et ce en utilisant une large population de référence d'animaux génotypés et phénotypés pour ces caractères (Humblot et al., 2010). Il est alors devenu possible d'établir des équations de prédiction combinant les SNP d'intérêt afin d'estimer la valeur génétique des jeunes mâles candidats dès leur naissance. La semence des jeunes taureaux sélectionnés pouvait alors être diffusée dès leur puberté ce qui a permis de réduire de moitié l'intervalle entre les générations (en moyenne 21 mois), d'augmenter l'intensité de sélection et le progrès génétique annuel contribuant ainsi à la compétitivité et à la durabilité de l'élevage (Scheffers and Weigel, 2012). La formule décrivant le progrès génétique est la suivante :

$$\text{Progrès génétique} = \frac{\text{variabilité génétique} \times \text{intensité de sélection} \times \text{précision de sélection}}{\text{Intervalle de génération}}$$

Le contrôle des performances de la descendance a été maintenu pour s'assurer de la fiabilité des prédictions, la descendance ne venant que confirmer l'index génétique calculé sur la base du génotypage (Figure 1 B.), mais également pour les races n'ayant pas accès à la sélection génomique faute de population de référence suffisamment grande.

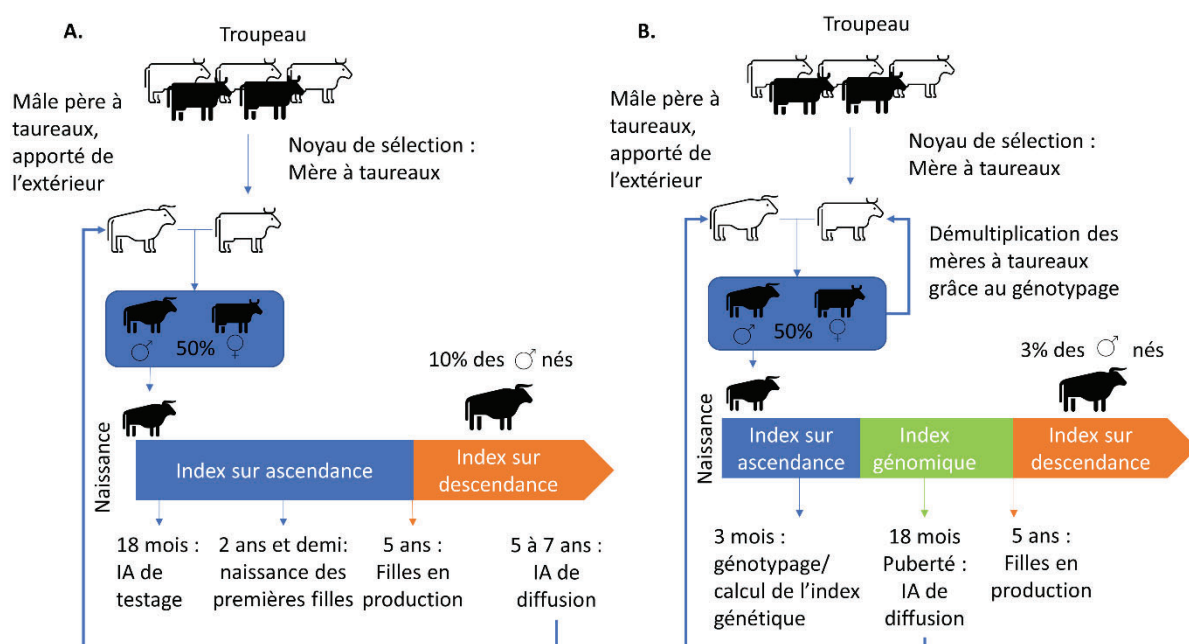


Figure 1. Evolution des schémas de sélection, (A) avant et (B) après l'arrivée de la sélection génomique, en bovin laitier.

Le génotypage étant également accessible aux femelles, la sélection génomique a permis un ciblage efficace et précoce des mères à taureaux conduisant à la création de stations de donneuses où les

femelles les plus intéressantes sont utilisées pour produire plusieurs dizaines d'embryons selon des accouplements raisonnés. Ces structures, avec les taurelleries, permettent de démultiplier les meilleurs accouplements pour augmenter la pression de sélection et ainsi les chances d'obtenir une nouvelle génération de reproducteurs exceptionnels (futures mères à taureaux et futurs taureaux d'insémination).

En station de donneuses, la production d'embryons peut se faire *in vivo* ou *in vitro*. Dans les deux cas les embryons peuvent être génotypés par analyse du génome de quelques cellules embryonnaires prélevées par biopsie (coupe ou aspiration). L'indexation des embryons, réalisée en une dizaine de jours, nécessite leur congélation avant d'être transférés mais possède l'énorme avantage de permettre l'identification, avant le transfert, des embryons à haut potentiel génétique et ainsi d'éviter de faire naître des animaux non souhaités et coûteux pour le schéma (notamment les mâles non conservés pour la production de semence).

Pour la production d'embryons *in vivo*, les femelles pubères suivent un protocole de synchronisation et de superovulation permettant d'obtenir plusieurs ovulations synchrones libérant une dizaine d'ovocytes matures. Les femelles sont ensuite inséminées et les embryons sont collectés environ 7 jours post-insémination (MOET : multiple ovulation and embryo transfer). Les embryons de bonne qualité morphologique, selon des critères de l'International Embryo Society Transfer (IETS), sont transférés dans des femelles receveuses préalablement synchronisées (Chapitre 9, Annexe D, IETS, 3^{ème} édition). En Europe en 2020, 9,3 embryons étaient collectés en moyenne par session de production *in vivo* d'embryons et parmi eux 6,2 étaient jugés de qualité suffisante pour être transférables (Statistiques AETE, 2020). Les collectes d'embryons peuvent être effectuées toutes les 6 semaines et permettent une augmentation du nombre de veaux dans un laps de temps donné, par rapport à l'IA. Les accouplements peuvent être raisonnés à la collecte.

Pour la production d'embryons *in vitro*, les ovocytes sont prélevés par ponction par voie transvaginale échoguidée (Ovum Pick-Up ou OPU) sur une femelle donneuse préalablement synchronisée et éventuellement superovulée. Les ovocytes récupérés sont alors mis en maturation *in vitro* pendant 22h puis sont fécondés *in vitro* pendant 18h et enfin cultivés *in vitro* pendant 6 jours. Au terme du développement *in vitro*, les embryons de bonne qualité morphologique sont transférés sur des femelles receveuses préalablement synchronisées (Chapitre 9, Annexe D, IETS, 3^{ème} édition). En Europe en 2020, l'OPU-FIV (fécondation *in vitro*) permet en moyenne l'obtention de 11,4 complexes ovocyte-cumulus (COC) et 2,6 embryons par OPU-FIV (Statistiques AETE, 2020).

En théorie, cette technique d'OPU-FIV permet une augmentation du nombre de veaux obtenus dans un laps de temps donné par rapport à la production *in vivo* (Merton et al., 2003). En effet, couplée à un protocole de superovulation, l'OPU-FIV est réalisable toutes les deux semaines, sur femelles non gestantes mais également gestantes (30 à 100j). De plus, l'accouplement peut être raisonné à l'échelle de l'ovocyte en OPU alors qu'en MOET il ne peut être raisonné qu'à l'échelle de la femelle, permettant ainsi une plus grande diversité d'accouplements pour le même nombre d'embryons produits (Ponsart et al., 2013). Cette multiplication des accouplements pour une même femelle donneuse permet ainsi une augmentation de la diversité génétique (Humblot et al., 2010).

Enfin, la technique d'OPU-FIV permet également de réduire encore davantage l'intervalle de génération par l'utilisation de femelles prépubères, ce qui n'est pas possible pour la MOET (Baldassarre et al., 2018; Currin et al., 2017). Le pourcentage d'ovocytes jugés utilisables a cependant tendance à augmenter lorsque les femelles sont plus âgées ($84,2 \pm 22\%$ pour des animaux de moins de 100 jours vs. $93,6 \pm 20\%$ pour des animaux de plus de 130 jours) tout comme les taux de blastocystes (respectivement $19,9\%$ vs. $9,8\%$). La qualité des embryons pourrait également être impactée puisque le nombre moyen de cellules par embryon est plus faible lorsque les embryons sont issus de femelles de moins de 100 jours en comparaison à celles de plus de 130 jours avec respectivement $91,5$ vs. $119,1$ cellules par embryon (Baldassarre et al., 2018). Bien que les taux de gestation obtenus après transfert d'embryons produits à partir de femelles prépubères étaient relativement faibles (4-45%) (Armstrong et al., 1997; Revel et al., 1995), il semblerait que de nouveaux résultats soient plus encourageants. En effet, une étude a récemment montré qu'après transfert de 21 blastocystes produits par OPU-FIV à partir de femelles prépubères, 13 (62%) avaient initié une gestation (Currin et al., 2017, 2021).

Compte-tenu de ces avantages, on observe depuis une dizaine d'années au niveau mondial une augmentation du recours à l'OPU-FIV et une diminution de l'intérêt pour la collecte d'embryon (Figure 2 A.). En 2016, pour la première fois depuis l'existence des technologies de l'embryon, plus d'embryons étaient produits par OPU-FIV à l'échelle mondiale que par MOET. Le nombre d'embryons produits *in vitro* et transférés en Europe est ainsi passé, entre 2010 et 2019, de 5 660 à 19 786 et en France de 130 à 1909 (Statistiques AETE, 2020). Mais cette augmentation au niveau mondial est plus liée au développement spectaculaire de l'OPU-FIV sur le continent américain, aussi bien au Nord avec les Etats-Unis qu'au Sud avec le Brésil (Figure 2 B.). Au niveau mondial, en 2019,

60 488 collectes ont été réalisées permettant le transfert de 319 961 embryons soit en moyenne 5,3 embryons par collecte. Concernant l'OPU-FIV, 205 104 OPU ont été réalisées permettant l'obtention de 1 010 680 embryons transférables soit en moyenne 4,9 embryons par OPU-FIV.

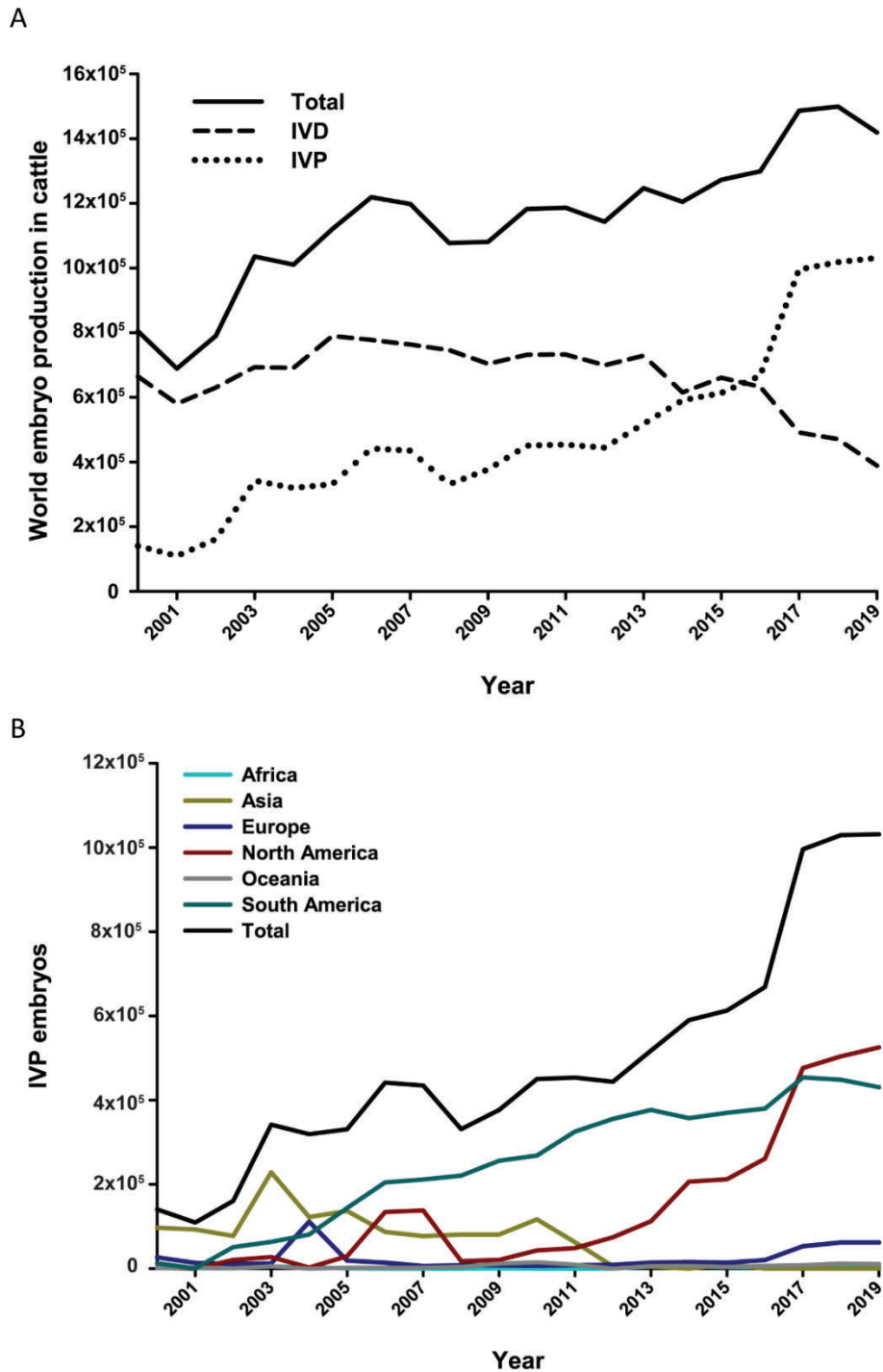


Figure 2. A. Nombre d'embryons bovins (produits *in vivo* ou *in vitro*, ainsi que le total) enregistré au cours de la période 2001-2019. B. Nombre d'embryons bovins produits *in vitro* au cours de la période 2001-2019 par continent. Tiré du rapport de l'I.E.T.S. 2019.

L'efficacité générale de ces biotechnologies de la reproduction s'évalue de façon globale en tenant compte également des taux de vêlage et de la santé des veaux nés.

Même si l'OPU-FIV s'avère plus intéressante en termes de production d'embryons, la qualité des embryons produits *in vitro* reste inférieure à celle des embryons produits *in vivo* conduisant à des taux de gestation contrastés et réduisant ainsi l'efficacité globale de cette approche. En effet, environ 70% des embryons bovins produits *in vitro* et transférés à l'état frais ne s'implantent pas après transfert au stade blastocyste expansé contre environ 45% pour les embryons produits *in vivo* (De Sousa et al., 2017). Le processus de production *in vitro* semble donc délétère pour le bon développement des embryons et affecterait leur qualité, limitant ainsi l'intérêt de la technique.

La production d'embryons par OPU-FIV implique des investissements lourds en station de donneuses du fait de la nécessité de produire les embryons *in vitro* au sein d'un laboratoire de production *in vitro* (PIV). De plus pour maintenir un nombre élevé de veaux nés pour le schéma, il est primordial de réaliser de nombreux transferts nécessitant un effectif élevé de receveuses ce qui constitue un frein à l'essor de cette technologie. L'amélioration de la qualité des embryons issus d'OPU-FIV, dans l'optique d'égaliser les taux de gestation obtenus avec des embryons produits *in vivo*, est donc un enjeu économique fort.

Malgré les efforts de recherche entrepris en ce sens, les conditions de culture *in vitro* utilisées à ce jour aboutissent à la production d'embryons de moins bonne qualité. Le processus de production *in vitro*, impliquant notamment des additifs d'origine animale, entraîne une accumulation de lipides cytoplasmiques augmentant la cryosensibilité des embryons (Abe, Yamashita et al. 2002, Sudano, Paschoal et al. 2011). Lors du processus de congélation, les embryons subissent une déshydratation afin d'éviter la formation de cristaux de glace (Wolfe et Bryant, 2001). Cette déshydratation va s'accompagner d'une déformation des membranes cellulaires. Ces membranes sont majoritairement composées de lipides directement reliés à la compétence au développement et au succès à la cryoconservation (Pereira et Marques, 2008; Seidel, 2006). Moduler le profil lipidique des embryons produits *in vitro* est donc une piste de recherche intéressante pour l'amélioration de la qualité embryonnaire.

L'optimisation des protocoles de cryoconservation eux-mêmes permettrait de limiter l'impact sur les embryons, notamment en préservant les membranes cellulaires qui sont principalement atteintes lors de la descente en température (Arav et al., 1996). De plus, la présence d'additifs

d'origine animale (sérum) au sein des milieux de cryoconservation n'assure pas une sécurité sanitaire complète pouvant entraîner la contamination de l'embryon et de la receveuse par des virus comme celui de la BVD (Diarrhée virale des bovins), résistant à l'irradiation, à l'inactivation thermique (56°C pendant 30 min) et à la cryoconservation (Bielanski et Lalonde, 2009; Rossi et al., 1980). Développer des milieux entièrement synthétiques permettant l'obtention de résultats de cryosurvie élevés tout en apportant une garantie sanitaire supérieure est donc un enjeu économique fort (Houe, 2003).

Un autre levier d'amélioration est la technique de biopsie qui aujourd'hui s'effectue dans les entreprises de sélection par coupe de quelques cellules au stade morula compactée ou au stade blastocyste expansé, soit 6 à 7j après la fécondation. Cette technique invasive permet un génotypage dans plus de 90% des cas (Humblot et al., 2010). D'autres techniques existent comme l'aspiration d'une cellule au stade morula, lorsque les blastomères n'adhèrent pas encore entre eux, mais nécessitent l'utilisation de lasers, très coûteux (60 000€) ou d'une pipette biseautée pour la découpe de la zone pellucide. Cette technique, moins rapide et pratique que la coupe n'est pas utilisée par les entreprises de sélection alors qu'elle semble moins dommageable pour l'embryon, n'entraînant pas la découpe d'une partie importante de la zone pellucide. Ces résultats ont été confirmés par l'évaluation des taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés à l'aide de ces différentes techniques et conduisant à des taux de gestation de 31% et 57%, respectivement pour les embryons biopsiés par coupe et par aspiration de blastomères (Cenariu et al., 2012). L'aspiration du liquide blastocoelique est une technique semi invasive évitant le prélèvement cellulaire, elle est cependant peu efficace. En effet, l'ADN prélevé dans le liquide blastocoelique serait présent en faible quantité/qualité ce qui ne permettrait une amplification que dans 27,4% des cas. De plus l'haplotype (ensemble de gènes situés sur un même chromosome et transmis ensemble) ne serait que peu concordant avec celui issu de la découpe de blastomères (2.9% de concordants sur 69 échantillons) (Leaver et Wells, 2020). Enfin le prélèvement du milieu de culture des embryons contenant potentiellement des cellules exclues et donc de l'ADN, représente une technique non invasive mais comme l'aspiration du liquide blastocoelique, demande à être optimisée du fait des taux variables de génotypages réussis, de l'ordre de 7 à 95% selon les études (Capalbo et al., 2018; Leaver et Wells, 2020). Bien que la quantité/qualité d'ADN soit supérieure à celle du liquide blastocoelique (Shamonki et al., 2016), il semblerait que les constituants d'origine animale présents dans les milieux de culture (comme le sérum) puissent être contaminés par de

l'ADN et biaiserait les résultats de génotypage (Leaver et Wells, 2020). Que les embryons produits *in vivo* soient biopsiés ou non, les taux de gestation après 60j ne diffèrent pas et sont respectivement de 54,2% et 55,8% (De Sousa et al., 2017). Des résultats similaires ont été obtenus après transfert d'embryons produits *in vivo*, biopsiés puis congelés, où les taux de gestation étaient de 54.2% après 90 jours (Guyader-Joly et al., 2008). Lorsque les embryons sont produits *in vitro*, les taux de gestation sont plus faibles mais ne diffèrent pas, que les embryons soit biopsiés ou non, respectivement 26,4% et 19,8% (De Sousa et al., 2017). Une étude rétrospective récente, réalisée à partir de 1713 embryons produits par OPU-FIV, a permis de mettre en évidence que les embryons biopsiés permettaient l'obtention de 52,1% de gestation et de 40,9% de mise bas (Silvestri et al., 2021). Une autre étude a mis en évidence qu'il était possible d'obtenir des taux de gestation de 43% (18/42) avec des embryons produit *in vitro*, biopsié et vitrifiés (Fisher et al., 2012). Au niveau mondial en 2019, très peu d'embryons ont été biopsiés pour être sexés ou génotypés. Sur l'ensemble des embryons transférés en 2019 (in vivo et in vitro), soit 1 117 151 embryons, seuls 19 694 ont été biopsiés, soit 1.8% (Statistique IETS, 2019). De plus, le peu d'études disponibles sur les effets de la biopsie ne permettent pas de conclure avec certitude quant à son impact sur les taux de gestation, notamment pour les embryons produits *in vitro*.

En conclusion, les taux de gestation après transfert embryonnaire sont impactés par l'ensemble du processus de production, du choix de la femelle donneuse et du père, en passant par le système de production, *vivo* ou *vitro*, aux techniques de biopsie, de congélation ou de transfert. L'objectif appliqué de cette thèse étant d'améliorer la viabilité après cryoconservation des embryons bovins produits *in vitro* et biopsiés, deux axes de travail ont été étudiés. Le premier pour essayer d'améliorer la qualité des embryons produits *in vitro* avant biopsie et congélation pour augmenter leur congélabilité. Le deuxième pour optimiser les protocoles de congélation et les rendre moins délétères pour les embryons. Les autres axes de travail tels que l'optimisation des protocoles de biopsie ou de transferts des embryons n'ont pas été traités dans cette thèse.

Etude bibliographique

Chapitre 1. Comment améliorer la qualité et la congélabilité des embryons bovins produits in vitro et biopsiés ?

Améliorer la congélabilité des embryons revient à améliorer leur qualité dont l'évaluation n'est pas chose aisée. La finalité est bien d'augmenter le taux de veaux en bonne santé obtenus après transfert mais il semble techniquement et financièrement illusoire d'évaluer l'impact de chaque modification de protocole sur la réussite au transfert. En effet, pour valider statistiquement une différence de taux de gestation de 10% entre deux lots expérimentaux avec un risque alpha de 5%, il faudrait environ 400 transferts par groupe expérimental. Ainsi, le recours à des critères d'évaluation indirects de la qualité embryonnaire est un prérequis nécessaire à l'optimisation des technologies de l'embryon.

Aujourd'hui, l'évaluation de la qualité embryonnaire repose essentiellement sur une appréciation visuelle qui permet de classer les embryons selon des critères morphologiques. Un embryon est donc considéré de bonne qualité lorsqu'il correspond à son stade de développement prévu (Figure 3.).

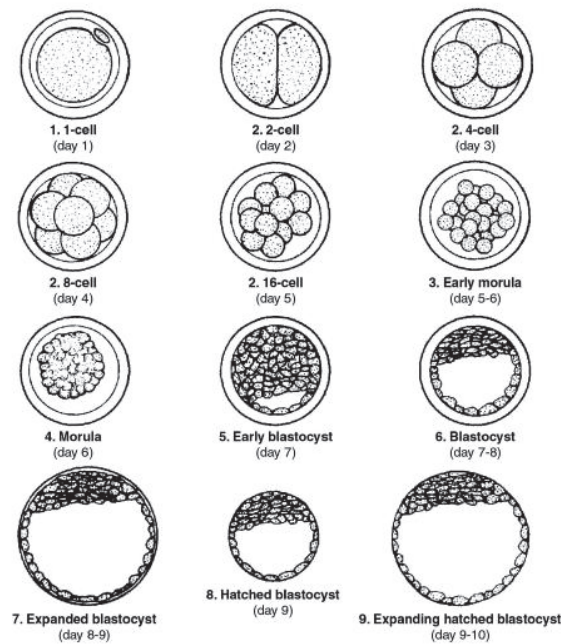


Figure 3. Code numérique du stade de développement embryonnaire chez les bovins. 1 = embryon non fécondé ou embryon unicellulaire ; 2 = embryon de 2 à 16 cellules ; 3 = morula précoce ; 4-9 = embryon au stade post-compaction (Selon la 4ème édition du manuel de l'I.E.T.S).

Les principaux critères pour qualifier un embryon au stade blastocyste expansé d'excellente qualité sont : des blastomères de taille, de couleur et de densité uniformes, avec une masse cellulaire compacte et bien différenciée, l'absence de cellules exclues et une zone pellucide intacte et lisse (Chapitre 9 et Annexe D, 3^{ème} Edition, Manuel de l'I.E.T.S.).

Lorsque les embryons sont produits *in vivo*, les résultats de gestation varient en fonction de la qualité morphologique des embryons, en effet, lorsque des embryons sont qualifiés de qualité 1, qu'importe le stade (morulas, blastocystes, blastocystes expansés) les taux de gestation à 60j sont de 40,7% contre 27,7% pour les embryons de qualité 2 (Merton et al., 2003). Cependant il semblerait qu'évaluer la qualité avant le stade blastocyste ne soit pas un critère fiable. En effet, des morulas de qualité 3 produites *in vivo* ont été collectés et cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste et des transferts ont été réalisés. Le taux de gestation moyen était de 51,1%, qu'importe la qualité des blastocystes. Aucune différence de taux de gestation n'a été mise en évidence entre les blastocystes de qualité 1 ou 2, respectivement 65,0 vs. 60,0%. Seul les blastocystes de qualité 3 ont entraîné une diminution des taux de gestation (29,4%) (Alvarez et al., 2008). L'évaluation de la qualité morphologique n'est pas un critère parfait. D'autres approches peuvent être développées sur les embryon produits *in vitro* (imagerie, métabolisme, morphocinétique), mais la production *in vivo* offre peu d'alternatives à l'évaluation morphologique. On constate cependant des différences morphologiques entre les embryons produits *in vivo* et *in vitro*.

Globalement les embryons produits *in vitro* sont plus sombres, ont de plus gros blastomères dans les premiers clivages, un espace périvitellin réduit, une compaction incomplète des morulas avant la blastulation et sont parsemés nombreuses gouttelettes lipidiques (Crosier et al., 2001; Rizos et al., 2002; Sudano et al., 2011) (Figure 4.).

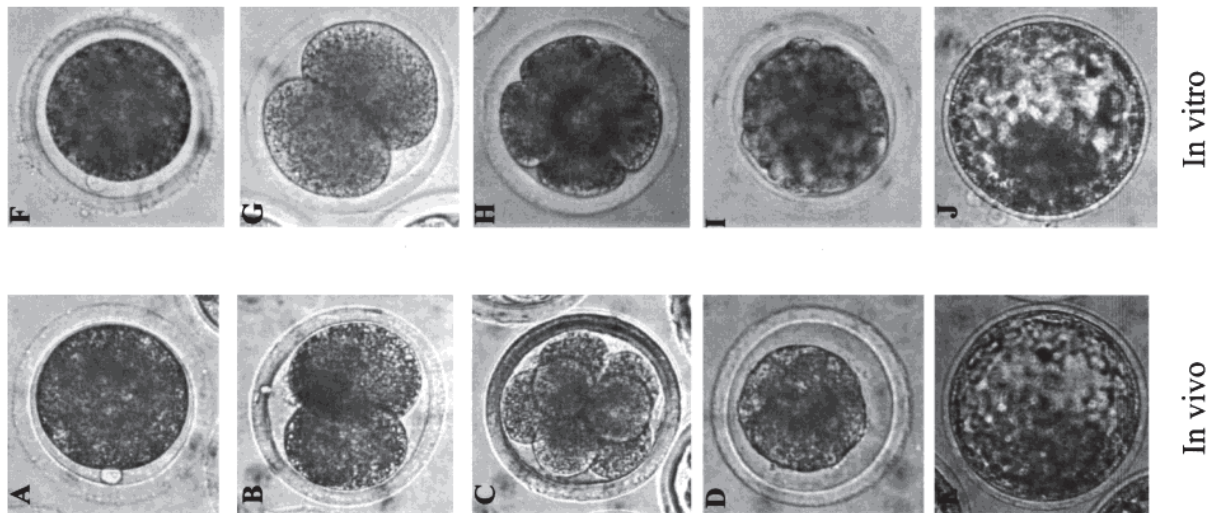


Figure 4. Morphologie d'embryons bovins produits *in vivo* (A-E) ou *in vitro* (F-J). Les différentes photographies représentent des ovocytes matures (A et F), des embryons au stade 2 cellules (B et G), des embryons au stade 8 cellules (C et H), des morulas (D et I) et des blastocystes (E et J). Tiré de (Rizos et al., 2002).

La qualité embryonnaire au stade blastocyste dépend fortement de la qualité de l'ovocyte avant fécondation. En effet Rizos et al., ont démontré que lorsque les ovocytes sont maturés *in vivo* (prélevés dans des follicules pré ovulatoires) les taux de blastocystes après 7 jours de développement sont supérieurs à ceux obtenus à partir d'ovocytes issus de petits follicules et maturés *in vitro*, respectivement, 48,5% vs. 31,7%. De plus, si les embryons FIV se développent *in vivo* (transfert provisoire dans l'oviducte de brebis, leur taux de survie à la vitrification est plus élevé que s'ils se développent *in vitro* (Rizos et al., 2002).

Pour comprendre pourquoi les embryons produits *in vitro* sont de moindre qualité que leurs homologues produits *in vivo*, l'analyse de ce qui se passe au niveau physiologique a été réalisée puis comparée à ce que l'on essaie de reproduire *in vitro*.

1. Le gold standard : Développement embryonnaire in vivo de l'ovocyte jusqu'au blastocyste

1.1. Maturation in vivo

Chez la vache le cycle ovarien dure en moyenne 21 jours et comprends deux phases, la phase folliculaire comprenant l'oestrus et la phase lutéale. La phase folliculaire est caractérisée par la croissance de follicules qui aboutit à la maturation et à l'ovulation d'un ovocyte issu du follicule dit dominant. La phase lutéale ou de dioestrus a lieu après l'ovulation. Le follicule ovulé devient corps jaune. Après l'ovulation, l'ovocyte se retrouve dans l'oviducte, organe dynamique, où se déroulent des événements spécifiques : la fécondation, au niveau de l'ampoule et le développement précoce de l'embryon jusqu'à la blastulation dans l'isthme, puis l'embryon passe dans la corne utérine. Si l'ovulation aboutit à une gestation, alors le corps jaune se maintiendra et sécrètera de la progestérone permettant le maintien de la gestation, sinon il régressera (Figure 5.) (Moore and Thatcher, 2006).

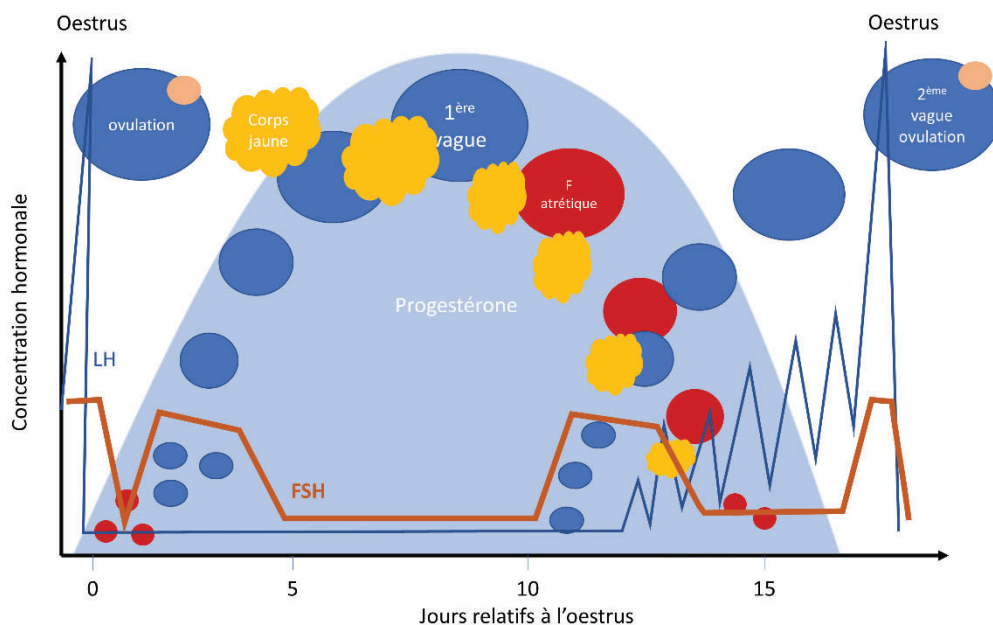


Figure 5. Schémas du cycle œstral bovin adapté de (Moore and Thatcher, 2006). Après l'oestrus, le follicule ovulé devient corps jaune et va sécréter de la progestérone qui va entraîner un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des hormones LH et FSH. Si l'ovocyte ovulé n'est pas fécondé et n'aboutit pas à une gestation, le corps jaune régresse. Une seconde vague folliculaire va se développer sous l'augmentation des sécrétions de FSH et le retour des sécrétions pulsatiles de LH et ce jusqu'au pic de LH déclenchant l'ovulation suivante.

La croissance folliculaire ou folliculogénèse est un processus continu initié à partir de la réserve de follicules primordiaux jusqu'à l'ovulation ou l'atrophie des follicules en croissance. Elle résulte à la fois de la croissance de l'ovocyte et de la multiplication des cellules de la granulosa mais aussi du développement de l'antrum lors des dernières étapes de la folliculogénèse. *In vivo* la croissance du follicule et celle de l'ovocyte s'effectuent parallèlement dans les follicules primaires et secondaires. Quand apparaît l'antrum, la croissance de l'ovocyte ralentit tandis que celle du follicule se poursuit jusqu'à l'ovulation. L'ovocyte acquiert sa capacité à reprendre sa méiose lorsqu'il atteint 80% de sa taille finale, peu après la formation de l'antrum, mais *in vivo* l'environnement folliculaire inhibe la méiose jusqu'à la décharge ovulante de LH (luteinizing hormone) (Monniaux et al., 2009). La maturation cytoplasmique est surtout visible par la migration des granules corticaux au niveau du cortex ovocytaire mais comporte d'autres mécanismes encore mal connus.

L'ovocyte sécrète des facteurs qui régulent les fonctions des cellules du cumulus qui transportent les molécules nécessaires à la croissance et la maturation ovocytaire à la fois nucléaire et cytoplasmique. Ces facteurs circulent entre l'ovocyte et les cellules du cumulus et de la granulosa par le fluide folliculaire et des projections cytoplasmiques traversant la zone pellucide (ZP) (Figure 6.) (Roelen, 2019). Ces projections sont estimées à plus de 3000 par COC et l'inhibition de ce moyen de communication entraîne la stérilité des individus (Gilchrist et al., 2008).

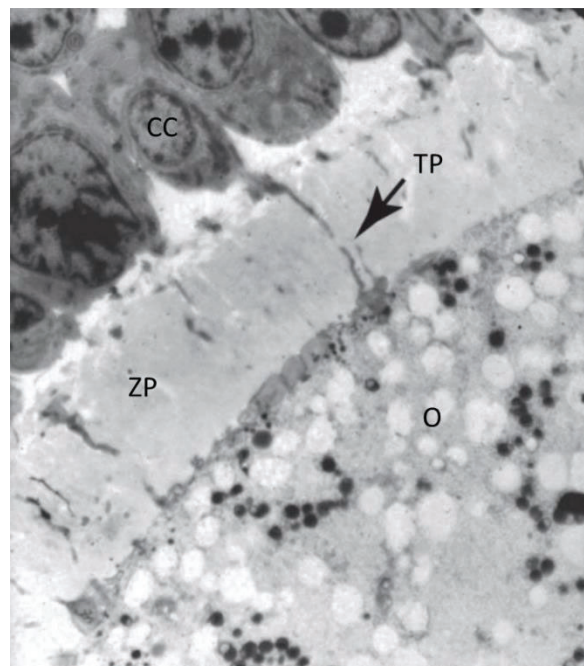


Figure 6. Projections transzonales. Image d'un ovocyte (O) bovin capturé par microscopie électronique à transmission, entouré de sa zone pellucide (ZP) et de cellules du cumulus (CC). La flèche indique une projection transzonale d'une cellule du cumulus reliant l'ovocyte.

1.2. Fécondation *in vivo*

In vivo, au cours de son cheminement dans l'oviducte, l'ovocyte est en contact avec le fluide oviductal. L'oviducte est un organe tubulaire connectant l'ovaire à la corne utérine. Sa structure stratifiée (couche séreuse, musculaire et muqueuse) dépend des différentes sections qui le composent que sont l'infundibulum, l'ampoule (lieu de fécondation) et l'isthme. La muqueuse est recouverte de cellules ciliées et sécrétrices, dont le ratio dépend de la localisation au sein de l'oviducte et de la période du cycle œstral. Ainsi, au 3^{ème} jour du cycle, l'ampoule contient 70% de cellule sécrétrices, pourcentage qui diminue jusqu'à l'isthme qui n'en contient que 20% (Kölle et al., 2009). Cet organe subit des changements physiologiques au cours du cycle œstral qui contribuent à établir un environnement optimal pour les gamètes puis, ultérieurement, pour l'embryon. Bien que les mécanismes par lesquels l'oviducte module la composition de son fluide restent inexpliqués, des variations de concentrations hormonales et protéiques, de composition lipidique et métabolique ont été observées. Les concentrations d'œstradiol et de progestérone oviductales varient en fonction du cycle œstral de la même manière que les concentrations plasmatiques (Lamy et al., 2016). La plus haute concentration de progestérone a été observée en milieu de phase lutéale alors que pour l'œstradiol, la plus haute concentration a été retrouvée en phase pré-ovulatoire. Or, les œstrogènes stimulent les contractions et sécrétions ainsi que le taux de cellules ciliées de l'oviducte tandis que la progestérone fait l'inverse (Younis et al., 1989). De cette manière le volume des sécrétions est régulé tout au long du cycle œstral. Durant la phase lutéale le volume des sécrétion ne dépasse pas 0,2 mL par jour alors qu'il atteint 2,0 mL en phase d'oestrus (Saint-Dizier et al., 2019). L'augmentation de la concentration en œstradiol en phase pré-ovulatoire préparerait donc l'oviducte à recevoir l'ovocyte et les spermatozoïdes. Au sein de l'oviducte, le glucose-1-phosphate est le métabolite dont la concentration est la plus impactée par le stade du cycle œstral. Sa concentration est 5 à 6 fois plus élevée pendant la phase lutéale qu'en période pré ovulatoire et serait corrélée aux concentrations de progestérone. La progestérone stimulerait le catabolisme du glycogène conduisant à une augmentation de glucose-1-phosphate dans l'épithélium oviductal et sa libération dans le fluide oviductal durant la phase lutéale (Lamy et al., 2018). Concernant le profil lipidique du fluide oviductal, une augmentation de de la concentration en phospholipides en phase pré-ovulatoire a été mesurée (Banliat et al., 2020) et pourrait favoriser la capacitation spermatique.

Des échanges entre l'épithélium oviductal et les gamètes ou l'embryon ont également été mis en évidence. L'épithélium oviductal sécrète des oviductosomes (vésicules extracellulaires), agissant comme des cargos transportant, du compartiment maternel vers les gamètes et l'embryon, des composants clefs pour l'établissement d'une gestation (Al-Dossary and Martin-Deleon, 2016; Almiñana et al., 2017; Lopera-Vásquez et al., 2016). Il a été démontré que l'ajout de ces oviductosomes dans le milieu de culture des embryons conduisait à une augmentation des taux de blastocystes et ce du 6^{ème} au 9^{ème} jour de développement (Almiñana et al., 2017).

En plus de moduler sa composition, l'oviducte réagit à la présence de spermatozoïdes en optimisant son microenvironnement, via la régulation de la viscosité du fluide ou encore en adaptant la fréquence de battements des cellules ciliées, le tout permettant de faciliter la rencontre entre le complexe cumulo ovocytaire (COC) et les spermatozoïdes (Camara Pirez et al., 2020).

L'ovocyte ovulé, bloqué en métaphase II, est collecté par l'infundibulum et transporté jusqu'à l'ampoule où va se dérouler la fécondation. Le transport de l'ovocyte au sein de l'oviducte est classiquement attribué aux battements des cils épithéliaux et à l'activité des muscles lisses de la paroi oviductale, permettant l'écoulement des fluides et donc du complexe cumulus ovocyte (Coy et al., 2012). Pour entrer en contact avec l'ovocyte, les spermatozoïdes vont devoir traverser le cumulus oophorus, composé de matrice contenant principalement de l'acide hyaluronique et des cellules. L'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte entraîne une augmentation rapide et transitoire de la concentration calcique intracellulaire, nécessaire au réveil métabolique de l'ovocyte fécondé. Cette augmentation a plusieurs conséquences : le déclenchement de la réaction corticale et l'activation du zygote. La fécondation déclenche deux types de réactions permettant ainsi le blocage de la polyspermie. Au niveau de la membrane plasmique un blocage membranaire va se mettre en place par la dépolarisation de la membrane et des canaux calciques ainsi que par l'expulsion d'une protéine ovocytaire (JUNO), indispensable à l'adhésion/fusion des gamètes, dans l'espace péri vitellin (Bianchi et al., 2014; Wozniak and Carlson, 2020). Au niveau de la ZP la réaction corticale permet la libération des granules corticaux dans l'espace périvitellin, contenant différentes enzymes responsables de la modification la zone pellucide permettant de la rendre imperméable aux autres spermatozoïdes. Enfin l'activation du zygote se traduit par l'achèvement de la deuxième division méiotique et l'expulsion du 2^{ème} globule polaire (Bianchi and Wright, 2016).

1.3. Du clivage au blastocyste

Le développement pré implantatoire est défini par la période allant de la fécondation aux premiers contacts cellulaires entre le conceptus et l'endomètre maternel qui caractérise l'implantation. Cette période est plus ou moins longue entre les différentes espèces mammifères, elle dure en moyenne 20 jours chez les bovins. Durant cette période les premiers échanges entre l'embryon et la mère vont se mettre en place et ainsi confirmer une reconnaissance mutuelle et générer des effets bilatéraux, comme la modification de l'expression de nombreux gènes des cellules de l'oviducte et de l'embryon (Besenfelder et al., 2020; García et al., 2017). Durant les 4 premiers jours, l'embryon va progresser dans l'oviducte de l'ampoule à l'isthme dans lequel les conditions de température, de pH et de sécrétions dynamiques de fluides, sont optimales pour le développement embryonnaire. Cet environnement est donc déterminant pour la qualité des embryons bovins (Li and Winuthayanon, 2017).

La segmentation correspond aux premières divisions mitotiques de l'embryon. Si elle commence entre 27 et 32h post fécondation *in vitro* (Holm et al., 2002), *in vivo* la durée du premier cycle cellulaire ne peut pas être mesurée précisément du fait de l'ignorance du moment exact de l'ovulation ou de la fécondation. Lors des premières divisions mitotiques, le nombre de blastomères ne cesse de croître alors que la taille de l'embryon reste inchangée. Les deuxièmes et troisièmes cycles sont beaucoup plus courts, de l'ordre d'environ 9h pour le deuxième et de 11h pour le troisième (Holm et al., 1998). Jusqu'au stade 8 cellules, les blastomères vont conserver leur caractère totipotent non différencié où chaque cellule est encore capable de donner tous types cellulaires. Le 4^{ème} cycle est beaucoup plus long que les précédents, environ 45h et représente une étape cruciale pour la suite du développement puisqu'il correspond à l'activation du génome embryonnaire (EGA). A ce stade, la synthèse de transcrits embryonnaires est absolument nécessaire à la poursuite du développement. On parle alors de transition materno-embryonnaire (MET) puisque les facteurs maternels sont dégradés et laissent place aux premiers transcrits embryonnaires (Memili et al., 1998). Les premiers stades du développement se déroulent donc sans transcription et le développement de l'embryon dépend alors uniquement de l'information maternelle stockée sous forme de transcrits et de protéines au cours de l'ovogenèse (Li et al., 2010). La dégradation des facteurs maternels est progressive et certains ARN maternels sont encore présents au stade blastocyste (Figure 7.).

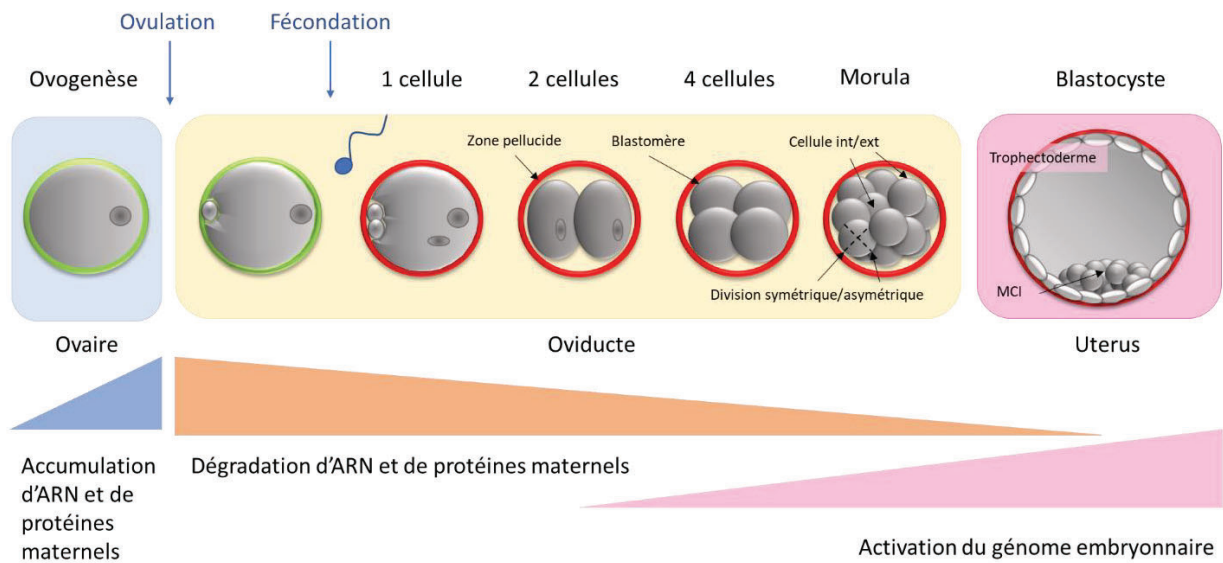


Figure 7. Développement pré-implantatoire bovin inspirée de (Li et al., 2010).

Le phénomène de la compaction qui se produit environ 120h post insémination chez le bovin, rend les contacts entre les blastomères plus étroits. (Holm et al., 1998). Ces jonctions serrées vont permettre l'initiation des premières divisions cellulaires orientées. Selon l'axe de division, symétrique ou asymétrique, une cellule mère aboutira, si l'axe est symétrique, à deux cellules externes, s'il est asymétrique à une cellule externe et une interne (Figure 8.). Les cellules externes formeront alors le trophoctoderme, organisées en épithélium, et les cellules internes le bouton embryonnaire ou masse cellulaire interne (MCI) composée de cellules totipotentes (Holm et al., 1998; Wicklow et al., 2014a).

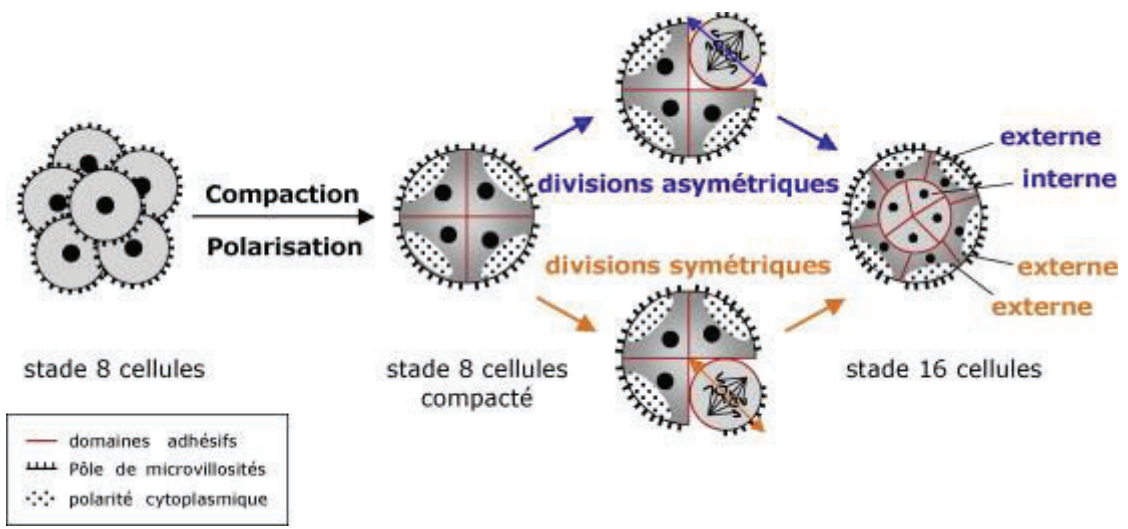


Figure 8. Compaction et divergence de lignage dans l'embryon pré-implantatoire (Dard, 2008).

Le phénomène de cavitation dépend en grande partie de la différenciation du trophoctoderme puisque son activité de transport d'ions et d'eau permet l'accumulation du liquide blastocoelique (Betteridge and Fléchon, 1988). Ce liquide, qui rentre par osmose dans la cavité blastocoelique, va engendrer une augmentation du diamètre de l'embryon. Le jeune blastocyste possède une centaine de cellules et une ZP d'environ 12 μ m d'épaisseur ce qui lui confère un diamètre externe d'environ 160 μ m (Betteridge and Fléchon, 1988). L'expansion du blastocyste va conduire à une diminution de l'épaisseur de la ZP au tiers de sa taille initiale. Le blastocyste va, par contraction/impulsion, rompre la ZP et enfin éclore. Du début de la blastulation à l'éclosion 6 à 10 contractions/impulsions sont achevées. L'éclosion résulte de la formation d'un point de perforation et non d'une lyse enzymatique, elle se déroule à partir de 174 hpi ou 7-8 jours post insémination (Holm et al., 1998). Après éclosion, le blastocyste retrouve son diamètre maximal (200-220 μ m) en environ 2h30 (Holm et al., 2002).

In vivo le développement embryonnaire précoce se fait en contact étroit avec l'environnement maternel. Contrairement au développement *in vitro*, l'environnement *in vivo* est dynamique et s'adapte en permanence pour répondre au mieux aux besoins évolutifs de l'embryon.

2. L'embryon produit *in vitro*

2.1. Développement *in vitro*, ce qui change par rapport au développement *in vivo*

Lors du processus d'OPU-FIV, les protocoles de superovulation permettent le développement de nombreux follicules qui seront ponctionnés directement au niveau de l'ovaire. Le protocole de superovulation permet de multiplier le nombre de follicules à ponctionner et permet l'augmentation des taux de blastocystes après 7j de développement en comparaison à un protocole réalisé sans stimulation ovarienne, respectivement, 58,8% vs. 50,6% (Sprícigo et al., 2015). L'inconvénient de la stimulation ovarienne et de la ponction ovarienne est que la population folliculaire stimulée est hétérogène et conduit à la ponction de follicules de différentes tailles et donc de différents stades de croissance, certains sont en retard, d'autres en atrophie. La différenciation de l'ovocyte est ainsi écourtée puisque directement après ponction, la méiose reprend (Pan and Li, 2019), ce qui prive l'ovocyte de 5 ou 6j durant lesquels il aurait pu continuer le stockage de transcrits maternels et de protéines en contact étroit avec les cellules somatiques du follicule. Cet ovocyte atteindra le stade métaphase II après maturation *in vitro* mais ses chances de se développer au stade blastocyste sont réduites en comparaison aux embryons issus de maturation *in vivo* (30% vs. 70%) (Rizos et al., 2002). *In vitro*, l'activation du génome embryonnaire est caractérisée par un ralentissement des divisions cellulaires voire même d'un arrêt du développement. Ainsi, cultiver des embryons *in vitro* dans des conditions sous-optimales a entraîné un arrêt du développement entre les stades de 8 à 16 cellules (Eyestone and First, 1991). En moyenne 50% des embryons produits *in vitro* ne passent pas le stade de la MET. Un arrêt temporaire du développement, appelé « phase lag » d'environ 45h a été observé chez les embryons bovins et ce serait durant cet arrêt que la majorité des événements de la transition embryo maternelle aurait lieu (Holm et al., 1998).

Il semblerait que cela ne soit pas les conditions de culture post fécondation qui impactent les taux de blastocystes mais bien la maturation ovocytaire. Il a été démontré que lorsque des ovocytes sont maturés *in vitro*, les taux de blastocystes étaient en moyenne de 35% alors que lorsque les ovocytes sont maturés *in vivo*, les taux avoisinent les 80% (Rizos et al., 2002). L'environnement oviductal est donc déterminant pour la qualité des embryons bovins (Li and Winuthayanon, 2017). Les systèmes de production *in vitro* d'embryons tentent de mimer certaines caractéristiques spécifiques de l'oviducte, dans le but de reproduire cette période du développement. Différentes stratégies ont donc été mises en place afin d'améliorer les conditions de culture *in vitro* via l'étude

du fluide oviductal. Les avantages que procurent le milieu oviductal ont été démontrés dans différents modèles, via la caractérisation des substances biologiques qu'il contient (Hunter, 2012). Cependant et de manière surprenante, l'ajout de milieu oviductal pur dans le milieu de culture des embryons à hauteur de 5, 10 ou 25% a un effet néfaste sur le développement embryonnaire, le taux de clivage ou de blastocyste. Par contre à des concentrations moindres (1,25% ou 0,625% v/v), la supplémentation des milieux de cultures *in vitro* en fluide oviductal a des effets positifs sur le développement et la qualité des blastocystes (Lopera-Vasquez et al., 2017).

Il est connu aujourd'hui qu'au cours du développement pré implantatoire, l'embryon utilise principalement pour substrat énergétique le pyruvate (Thompson et al., 1996). Rubessa et al., ont étudié l'appauvrissement du milieu de culture des embryons et ont mis en évidence une corrélation entre l'appauvrissement précoce (après 48h de culture) du milieu de culture des embryons, en citrate, pyruvate, myoinositol et lysine et le développement des embryons au stade blastocyste à J7 (Rubessa et al., 2016).

Ceci a permis le développement d'une panoplie de milieux, des milieux standards ou conditionnés, avec ajout de sérum ou de fluide d'oviducte (Lopera-Vasquez et al., 2017), des systèmes de cocultures 2D ou 3D avec des cellules épithéliales tubaires ou des milieux conditionnés par ces cellules et des systèmes de micro-fluidiques (Beebe et al., 2002). Cependant la production d'embryons *in vitro* expose les embryons à des conditions non naturelles pendant les premiers stades de développement.

2.2. Qualité de l'embryon produits *in vitro*

La viabilité des embryons produits *in vitro* est moindre que celle des embryons produits *in vivo* (Besenfelder et al., 2020; De Sousa et al., 2017; Enright et al., 2000). En effet, il a été démontré que plus les embryons passaient de temps *in vivo*, au sein de l'oviducte, meilleure était leur survie à la cryopréservation (Havlicek et al., 2010; Rizos et al., 2002). Les embryons produits *in vitro* possèdent une zone pellucide plus fragile, plus d'anomalies chromosomiques, ainsi qu'un métabolisme différent (Khurana and Niemann, 2000; Lonergan et al., 2004).

En effet les ovocytes maturés *in vitro* ont une production de lactate supérieure ($1,1 \pm 0,1$ pmoles au stade ovocyte) aux ovocytes produits *in vivo*, qui ont une activité métabolique ralentie et ne produisent pas de lactate. Cette différence de production de lactate se maintient durant tout le développement. Au stade blastocyte la production de lactate pour les embryons produits *in vitro* et *in vivo* est respectivement de $70,2 \pm 4,6$ vs. $20,8 \pm 5,0$ pmoles. Les conditions de culture suboptimales et le stress qu'elles engendrent pourraient expliquer cette différence (Khurana and Niemann, 2000).

Le processus de culture *in vitro* des embryons combine donc un ensemble de facteurs de stress physiques (variations de température, de pH de concentration d'O₂, pipetage, lumière) et chimiques (composition des milieux de culture), entraînant l'altération de l'expression de certains gènes ou la modification de certaines marques épigénétiques (Ramos-Ibeas et al., 2019).

L'addition de serum de veau fœtal (SVF) dans les milieux de culture des ovocytes et embryons, à hauteur de 15% dans le milieu de maturation des ovocytes et 5% dans le milieu de culture des embryons, stimule leur développement et permet la production de taux de blastocystes et d'éclosion supérieurs qu'en absence de sérum (Holm et al., 2002). En absence de sérum dans le milieu de maturation et de fécondation, la première et la quatrième division cellulaire sont prolongées de 4 à 5 h, alors qu'en présence de sérum la durée du quatrième cycle cellulaire est raccourcie et la blastulation précoce (Holm et al., 2002). Cette augmentation de la cinétique de développement est probablement due aux facteurs de croissance présents dans le sérum, comme l'EGF (epidermal growth factor), le TGFβ (transforming growth factor beta) le FGF2 (fibroblast growth factor 2) le PDGF (platelet-derived growth factor) et bien d'autres. Cependant, le sérum est un produit d'origine animale, potentiellement porteur de zoonoses, qui peut être responsable de problèmes sanitaires. Sa composition n'est pas définie et peut varier d'un lot à un autre entraînant des différences de composition des milieux de culture ne permettant pas d'obtenir des résultats reproductibles (Feugang et al., 2009). L'addition de SVF dans les milieux de développement embryonnaire a été associée avec une augmentation de la cryosensibilité, une augmentation des pertes fœtales et des complications durant la gestation comme le syndrome du gros veau (Rizos et al., 2003; Thompson, 1996). D'autres effets négatifs associés à l'ajout de SVF incluent l'augmentation de production de lactate par l'embryon, une augmentation du nombre de cellules apoptotiques, une diminution du développement des jonctions entre les cellules du trophoblaste et de la masse cellulaire interne (Shamsuddin and Rodriguez-Martinez, 1994) et une

accumulation anormale de gouttelettes lipidiques (Sudano et al., 2011; Thompson, 1996). La cause de cette accumulation de lipides au sein de l'embryon n'est toujours pas élucidée aujourd'hui mais beaucoup d'études l'attribuent à l'utilisation de SVF (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006). L'accumulation de lipides est responsable de dommages cellulaires lors de la cryopréservation. En effet, les dommages cellulaires causés lors de la transition de la phase liquide à solide sont d'autant plus marqués que les cellules sont riches en lipides (Amstislavsky et al., 2019; Arav et al., 1996). Ces effets diminuent la proportion d'embryons capable d'atteindre le stade blastocyste expansé, le nombre de cellules totales par embryon et le taux de survie post décongélation. Ainsi, un des défis actuels réside dans la suppression du sérum dans la composition des milieux de culture pour améliorer la qualité des embryons produits sans dégrader les taux de développement.

Une autre source de stress résiderait dans la culture des embryons sous une haute tension en oxygène qui favoriserait l'apoptose et augmenterait les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. Il a été montré que cultiver des embryons sous 5% d'oxygène permettrait de se rapprocher des conditions *in vivo* et donc d'augmenter les taux d'embryons de bonne qualité (Ciray et al., 2009), les taux de blastocystes à J8 ($43,1 \pm 5,0\%$ vs. $37,1 \pm 4,2\%$) (Bermejo-Alvarez et al., 2010), mais aussi de diminuer les niveaux de ROS ($6,57 \pm 0,71$ vs. $4,81 \pm 0,37$) et d'apoptose ($8,0 \pm 1,1\%$ vs. $4,7 \pm 0,6\%$) (Ma et al., 2017). L'étude de la mort cellulaire a montré que les embryons bovins produits *in vitro* présentaient un nombre de cellules apoptotiques et/ou nécrotiques supérieur à ceux produits *in vivo* (respectivement $4,5 \pm 7,5$ vs $1,2 \pm 1,7$) (Fear and Hansen, 2011; Pomar et al., 2005). Ces mêmes auteurs ont démontré que les embryons produits *in vitro* présentaient davantage de noyaux avec de la fragmentation de leur ADN que ceux produits *in vivo* (respectivement, $10,3 \pm 10,9$ vs. $4,5 \pm 3,1$). La mesure des niveaux d'expression de gènes de l'apoptose a montré que du stade ovocytaire au stade plus de 16 cellules les niveaux d'expression des gènes anti-apoptotiques diminuaient, notamment pour BCL2 (B-cell lymphoma 2) et HSPA1A (Heat shock protein 1) ($p < 0,05$) alors que ceux des gènes pro-apoptotiques augmentaient, notamment pour BAD (BCL2-antagonist of cell death) ($p < 0,05$) (Fear and Hansen, 2011). L'étude de l'apoptose semble donc être un bon marqueur de la qualité embryonnaire.

La mise en place des différents feuillet embryonnaires au cours des premiers stades de développement chez les bovins est également un critère de qualité. En effet, le développement embryonnaire chez les mammifères dépend dans un premier temps de l'individualisation des

premiers lignages cellulaires qui est la spécification du trophoctoderme (TE) et de la masse cellulaire interne (MCI). La mise en place de ces tissus primitifs est cruciale pour l'avenir du nouvel individu (Goissis and Cibelli, 2014a; Shi and Jin, 2010; Strumpf et al., 2005) et est observable microscopiquement chez les embryons bovins à partir du 7^{ème} ou 8^{ème} jour post-insémination (JPI) (Lonergan et al., 2016; Van Soom et al., 1997a). Le TE va participer à la mise en place des annexes embryonnaires. Contrairement à d'autres espèces (Strumpf et al., 2005), il a été démontré que même si la protéine caudal type homéobox 2 (CDX2), n'est pas requise pour la formation du TE chez les embryons bovins, elle est néanmoins nécessaire au maintien de son intégrité. En effet, la réduction de l'expression du gène CDX2, qui n'est exprimé qu'à partir du stade blastocyste, entraînerait une augmentation de la perméabilité membranaire et une désorientation du TE responsable d'une diminution du taux d'éclosion et d'implantation utérine (Goissis and Cibelli, 2014a; Wu et al., 2010). La MCI, quant à elle, se différencie tout d'abord en deux feuillets primitifs : l'hypoblaste et l'épiblaste primitif (Frankenberg et al., 2011a; Ortega et al., 2020a) ; ce dernier se différenciant par la suite en trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme (Goissis and Cibelli, 2014a; Strumpf et al., 2005). Les cellules de la MCI sont des cellules pluripotentes, qui ont donc la capacité de générer tous les types cellulaires de l'organisme (Shi and Jin, 2010; Wooldridge et al., 2019a). A noter qu'il a été démontré que les gènes de la pluripotence sont impliqués dans le développement précoce et le développement à long terme des embryons (Khan et al., 2012) soulignant l'importance d'une mise en place correcte des différents feuillets de la masse cellulaire interne pour leur survie (Wooldridge et al., 2019a). Au cours de cette période, non seulement la morphologie de l'embryon subit des modifications, mais des changements se produisent aussi dans les niveaux de transcription des gènes associés à la dynamique de développement précoce de l'embryon. Les facteurs de transcription requis pour le maintien de la pluripotence sont notamment POU class 5 homeobox 1 (POU5F1/OCT4) et SRY (sex determining region Y)-box transcription factor 2 (SOX2) (Marsico et al., 2019). L'hétérodimérisation de OCT4-SOX2 joue également un rôle essentiel dans le maintien de la pluripotence puisque son inhibition conduit à la transformation des cellules de la MCI en TE et donc à l'absence de conceptus viable (Avilion, 2003; Surani and Barton, 1977a). Cependant, à la différence d'OCT4 qui est observée dans les noyaux cellulaires de la MCI et du TE jusqu'au 9^{ème} jour de développement (Khan et al., 2012; Wicklow et al., 2014b), il a été montré que SOX2 est restreint à la MCI à partir du stade blastocyste (Goissis and Cibelli, 2014a, 2014b; Wicklow et al.,

2014b). Par conséquent, SOX2 semble être un candidat plus approprié pour étudier la MCI que OCT4 chez les bovins, au stade blastocyste expansé (Goissis and Cibelli, 2014b; Khan et al., 2012).

3. Quelles pistes d'amélioration du processus de PIV ?

3.1. Qualité des ovocytes immatures ponctionnés

De nombreux facteurs influencent la qualité ovocytaire, aussi bien des facteurs externes, tels que la nutrition et l'âge des femelles donneuses, le stress thermique ou n'importe quelles autres expositions environnementales délétères, que des facteurs ovariens tels que les stéroïdes, la composition du fluide folliculaire, le nombre de follicules antraux (Ireland et al., 2011; Zangirolamo et al., 2018) et bien d'autres. Ces facteurs sont interconnectés.

Comme présenté précédemment, les stéroïdes ovariens affectent l'environnement ovocytaire et participent à l'acquisition de la compétence développementale. Ainsi utiliser des protocoles de stimulation ovarienne adaptés permet de maximiser les résultats obtenus après OPU-FIV ou collecte d'embryons. Traditionnellement les traitements de superovulation chez les bovins consistent en une administration unique de gonadotrophine chorionique équine (eCG) ou à l'injection de FSH deux fois par jour sur 4-5 jours (Mapletoft and Bó, 2011). Bien que l'injection unique d'eCG ait un côté pratique du fait de sa demi-vie de 40h, il a été démontré qu'elle induisait une augmentation du nombre de follicules non ovulés et diminuait les taux de fécondation et d'embryons transférables affectant l'efficacité des protocoles (González et al., 1994). De plus, outre les conditions de production décrites aujourd'hui, l'apport de gonadotropine n'est pas maîtrisé avec l'eCG, contrairement aux injections répétées et décroissantes de FSH qui permettent de reproduire au mieux ce qui se passe physiologiquement.

Un autre moyen d'améliorer la qualité ovocytaire est de réaliser une phase de « coasting » en fin de traitement de superovulation, c'est-à-dire d'augmenter l'intervalle de temps entre la dernière injection de gonadotropines et la ponction ovocytaire (généralement 12h) afin de poursuivre au maximum la maturation ovocytaire *in vivo*. L'injection d'un antagoniste de la LH (cétrorélix) durant une période de coasting de 68h, permettant de retarder l'ovulation et de prolonger la maturation ovocytaire, ne serait finalement pas favorable à la maturation ovocytaire et entraînerait une augmentation du taux de COC avec 0 ou 1 couche de cellules du cumulus et une diminution du taux de COC avec 4-5 couches de cellules du cumulus. De plus, cette injection entraînerait une diminution du taux de blastocyste en comparaison aux femelles n'ayant pas reçu de cétrorélix (respectivement, 52,4% vs. 67,1%), mettant en avant l'importance de la LH dans la phase finale de la maturation ovocytaire pour la compétence au développement. L'absence de LH entraînerait également une diminution de l'expression de certains gènes pouvant entraîner une déformation

du fuseau méiotique (ATP6AP2), une reprise de méiose et une inhibition de la β -oxydation du cholestérol, limitant la production d'énergie dans les cellules du cumulus (SC4MOL) (Bunel et al., 2020).

Afin de se rapprocher des conditions physiologiques, il serait logique d'utiliser des protocoles de stimulation ovarienne « dynamiques » permettant d'augmenter progressivement les concentrations de LH tout en diminuant les concentration de FSH (Meyers-Brown et al., 2011). Cette évolution du ratio FSH/LH permettrait aux follicules recrutés sensibles à la LH de stimuler la production, par les cellules du cumulus, de facteurs importants pour la maturation et la compétence au développement de l'ovocyte, comme des facteurs EGF-like (amphiréguline, épériréguline) (Lindbloom et al., 2008).

La nutrition est un autre facteur important à prendre en compte et impactant la fonction de reproduction. Il a notamment été démontré que les acides gras saturés ont des effets néfastes sur la fonction de reproduction tandis que les insaturés semblent bénéfiques (Elis et al., 2016, 2017; Marei et al., 2016). Ainsi une alimentation optimisée dès la naissance est indispensable à la mise en place d'une fonction de reproduction normale.

Un autre point limitant est le stress thermique auquel aujourd'hui on fait face un peu partout dans le monde. Le stress thermique affecte la production, la reproduction, la nutrition, la santé et le bien-être des vaches laitières, dont l'optimum thermique se situe en moyenne entre 5 et 20°C. Le stress thermique entraîne une diminution de l'expression et de la détection d'oestrus, visible par une diminution de 50% des comportements de monte, entraînant une diminution du nombre d'insémination et/ou des inséminations au mauvais moment, contribuant à une baisse de la rentabilité. La diminution des performances de reproduction sur les mois d'été et d'automne entraîne une perte économique pour l'industrie laitière qui contribuerait à l'augmentation de l'intervalle de vêlage et des taux de réforme. Lorsque les vaches laitières sont exposées 21% de l'année à des conditions de stress thermique (Kentucky), la perte économique serait de 285\$/vache/an. Lorsque les vaches laitières sont exposées 49% de l'année à des conditions de stress thermique (Floride) la perte économique s'élèverait à 676\$/vache/an (Becker et al., 2020).

Enfin, les caractéristiques de la donneuse d'ovocytes sont indispensables à l'obtention de taux élevés de blastocystes. Aujourd'hui pour des questions de coûts, la majorité des études de production *in vitro* d'embryons se font à partir d'ovaire collectés *post-mortem* en abattoir. Or cette

stratégie expérimentale ne permet d'avoir aucune certitude sur l'état de santé, l'âge, l'alimentation, le statut physiologique ou encore la génétique des animaux abattus. Sprícigo et al., ont d'ailleurs démontré que lorsque les ovocytes sont issus d'ovaires d'abattoirs les taux de blastocystes après 7 jours de développement sont moins importants que ceux obtenus par OPU-FIV après stimulation ovarienne (37,9% vs. 58,8%, $p < 0,05$) (Sprícigo et al., 2015).

3.2. Contrôle du stress oxydatif et de l'apoptose

Comme évoqué précédemment, la maturation ovocytaire est particulièrement exposée à la production de ROS du fait de la tension en oxygène à laquelle elle est réalisée. En quantité physiologiques les ROS jouent un rôle de messagers dans la transduction de signaux dans les voies de reproduction. De trop faibles niveaux de ROS ont été associés à un dysfonctionnement cellulaire. Chez les mammifères, l'anion superoxyde présente des effets néfastes sur le spermatozoïde mais joue également un rôle essentiel dans le déclenchement d'événements cellulaires tels que la capacitation et l'hyperactivation, une exigence essentielle pour que ce dernier pénètre dans la zone pellucide (Aitken and Drevet, 2020). Ils participent également au fonctionnement cellulaire normal, comme le transport des hexoses par l'insuline ou encore la stimulation de l'activité de la tyrosine kinase C. Ainsi, une concentration modérée de ROS et de peroxyde lipidique reflèterait chez la femme un métabolisme actif et un follicule sain (Velthut et al., 2013). En condition normale, la cellule produit un niveau de ROS qui agit de manière bénéfique sur la régénération tissulaire, la régulation redox intracellulaire et l'embryogenèse, mais lorsqu'ils sont produits de manière excessive ils peuvent participer à l'oxydation de molécules telles que les lipides, les glucides, les acides aminés et nucléiques, modifiant leurs fonctions et compromettant la viabilité cellulaire. Ils entraînent alors une peroxydation lipidique, des dommages mitochondriaux et la mort cellulaire par apoptose (Ambrogi et al., 2017; Cillard and Cillard, 2006; Wang et al., 2017). La peroxydation lipidique est un phénomène très important affectant notamment les membranes des cellules qui sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50%). La lipopéroxydation des membranes va entre autres altérer leur fonctionnalité, leur perméabilité et leur fluidité (Cillard and Cillard, 2006). Les hydroperoxydes instables en se décomposant vont donner de nouveaux radicaux libres provoquant des oxydations de biomolécules, mais aussi des aldéhydes réactifs (4-HNE) qui seront responsables d'adduits sur les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Ainsi chez les souris, le 4-HNE, a été décrit comme compromettant la reprise de la méiose ovocytaire,

l'assemblage du fuseau méiotique ainsi que l'alignement des chromosomes (aneuploïdie) (Mihalas et al., 2017).

La composition lipidique des embryons bovins va donc à la fois moduler la gravité des impacts cellulaires liés aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), mais aussi augmenter les niveaux de ROS et le taux de cellules apoptotiques, affectant leur résistance à la cryopréservation. Les embryons bovins de l'espèce *Bos indicus* sont plus riches en lipides que les embryons issus de l'espèce *Bos taurus*, ils possèdent donc un taux de ROS et un taux de cellules apoptotiques plus élevés. Leur sensibilité accrue à la cryopréservation accroît ces différences post-décongélation en entraînant une forte augmentation du taux de peroxydation lipidique (López-Damián et al., 2019). L'ensemble de ces critères conduit à une diminution du taux de survie et du taux de gestation de ces embryons après transfert.

Ajouter des anti-oxydants, pour contrer les effets oxydatifs des acides gras à longues chaînes, est aujourd'hui systématique. Les antioxydants sont caractérisés par B. Halliwell comme « toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat » (Halliwell, 1990). Ainsi l'ajout d'anti-oxydants de type flavonoïde (nobilétine, resvératrol, quercétine ou taxifoline) durant la maturation ovocytaire permettrait une augmentation du taux d'ovocyte en métaphase 2, une diminution des taux de ROS et de glutathion, une augmentation de la stéroïdogénèse au niveau des cellules du cumulus ainsi qu'une augmentation des taux de blastocystes à J7 et J8 (Cajas et al., 2020; Kang et al., 2016; Wang et al., 2014).

Diminuer la tension en oxygène durant la maturation permettrait de limiter leur exposition à l'oxygène. Comme décrit précédemment la culture des embryons sous une faible tension en oxygène (5%) est favorable à leur développement. Appliquer cette même tension en oxygène lors de la maturation ovocytaire semble être un levier d'amélioration de la qualité des embryons bovins produits *in vitro* (Orsi and Leese, 2001). En effet lorsque les ovocytes sont cultivés sous 5% d'oxygène, le taux de blastocyste après 7 jours de développement *in vitro* est supérieur à celui obtenu sous 20% d'oxygène, soit respectivement 28% vs. 16% ($p < 0,05$) (Hashimoto et al., 2000). Cependant sous 5% d'oxygène, les milieux de maturation utilisés habituellement sous 20% d'oxygène ne sont plus adaptés. En effet, en condition aérobique, le pyruvate est le principal substrat énergétique utilisé par l'ovocyte (Khurana et Niemann, 2000). En condition anaérobique, le métabolisme aérobique comprenant la respiration mitochondriale est inhibée et la production

d'énergie passe du cycle de Krebs à la glycolyse anaérobie. Pour alimenter la glycolyse anaérobie des concentrations supérieures de glucose sont nécessaires. Il a été démontré que 20mM de glucose semble être une concentration optimale pour la maturation des ovocytes sous une faible tension en oxygène (Hashimoto et al., 2000).

Inhiber l'apoptose, est une autre solution pour améliorer la qualité des embryons produits *in vitro*. En effet, l'inhibition de l'apoptose permettrait d'augmenter les taux de développement embryonnaire, de diminuer les concentrations de ROS intracellulaires et le nombre de cellules apoptotiques tout en stimulant la prolifération cellulaire (Chowdhury et al., 2018; Mullani et al., 2016). Par exemple l'ajout de l'inhibiteur de caspase 9, (Z-LEHD-FMK), à hauteur de 20 μ M, permettrait l'augmentation des taux d'ovocyte en métaphase 2 (Chowdhury et al., 2017), des taux de clivage et de blastocystes ($19,72 \pm 2,18$ vs. $27,42 \pm 2,94$) ainsi qu'une diminution de l'index apoptotique ($1,88 \pm 0,20$ vs. $3,65 \pm 0,79$). L'ajout de lycopène à hauteur de 0,2 μ M dans le milieu de maturation et de culture des embryons permettrait une diminution des taux de cellules en apoptose, et ce via l'inhibition des caspases 3 et 9. Il permettrait également l'augmentation des taux de clivage ($84,2 \pm 1,2$ vs. $69,7 \pm 1,3$) et des taux de blastocyste ($40,6 \pm 1,7$ vs. $28,4 \pm 1,2$) (Chowdhury et al., 2018; Residiwati et al., 2021). Le lycopène permettrait également de réduire de moitié le contenu lipidique des ovocytes et des blastocystes.

3.3. Modulation du profil lipidique

Le métabolisme lipidique et donc le contenu en lipide des embryons est un facteur crucial pour l'obtention d'embryons de meilleure qualité, ce qui a conduit la communauté scientifique à mener des études pour tenter de le moduler.

3.3.1. Délipidation des embryons

L'utilisation de milieux séquentiels pour répondre aux besoins de l'embryon à un instant t du développement est une piste d'optimisation de la qualité embryonnaire. Une piste explorée par plusieurs auteurs est notamment la privation de sérum contenant des protéines et des lipides, principales sources d'énergie pour l'embryon, sur les dernières 24h de culture. La privation de sérum en fin de culture permet d'augmenter les taux de survie après dévitrification et transfert, de diminuer les pourcentages d'avortement et ainsi d'augmenter les pourcentages de vêlage (Gómez et al., 2017; Murillo-Ríos et al., 2017). L'augmentation d'expression du gène SREBP1 (Sterol regulatory element binding transcription protein 1), impliqué dans la biosynthèse du cholestérol et

des acides gras, dans les blastocystes lorsque ces derniers sont privés de protéines animales sur les dernières 24h de culture *in vitro*, serait notamment due à l'augmentation d'acides gras libres dérivés de la dégradation des lipides (Gómez et al., 2017). La privation de sérum permettrait donc de solliciter davantage les réserves lipidiques et d'obtenir des embryons moins gras supportant mieux le processus de cryopréservation. La privation de sérum est connue comme stimulus de la lipolyse (Singh et al., 2009). Sur cellules hépatiques et rénales murines la privation de sérum entraînerait une lipophagie, c'est-à-dire, la dégradation des gouttelettes lipidiques par les lysosomes cytoplasmiques (Martinez-Lopez and Singh, 2015; Minami et al., 2017). La dégradation des gouttelettes lipidiques permettrait alors la libération d'acides gras libres utilisés par la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie, permettant ainsi la production d'énergie. La lipophagie est un phénomène conservé entre les différents types cellulaires. Il a été démontré que cultiver des blastocystes à partir de J6, pendant 24h, sans apport de protéines, c'est à dire sans BSA mais en présence de polyvinyle alcool (PVA), permettrait une amélioration de la survie post vitrification et post transfert, avec une diminution des pertes de gestation (8% vs. 29%, $p < 0,05$) et une augmentation des taux de vêlage (56% vs. 44%, $p < 0,05$) (Gómez et al., 2020; Murillo-Ríos et al., 2017). L'utilisation du PVA serait donc une solution pour se passer de protéines d'origines animales. Il a été démontré que l'utilisation de 0,1mg/mL de PVA dans un milieu de composition adéquate permettait l'obtention de taux de blastocystes supérieurs à ceux obtenus avec un milieu contenant 8mg/mL de BSA, respectivement 48% vs. 32,4%, $p < 0,05$ (Lim et al., 2007). Une autre solution est l'utilisation d'un substitut synthétique au sérum dans la composition des milieux de culture, comme la phénazine ethosulfate, à hauteur de 0,3 μ M, qui permettrait d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus en présence de sérum, tout en permettant une diminution de la proportion de gouttelettes lipidiques au sein des embryons et une augmentation des taux de ré-expansion post vitrification (Ghanem et al., 2014; Sudano et al., 2011).

L'ajout d'un agent lipolytique est une technique non invasive permettant la réduction du taux de lipides intracellulaires, responsables de la sensibilité des blastomères à la cryopréservation. Il en existe plusieurs comme, l'épinéphrine, la norépinephrine, l'isoproterenol, la forskolin et bien d'autres, ayant la capacité de stimuler la lipolyse intracellulaire en agissant directement sur les composants des voies de la lipolyse. L'induction d'une lipolyse forcée par l'ajout de 10 μ M de Forskolin, dans le milieu de culture des embryons de genre *bos indicus*, 48h avant la vitrification permet d'augmenter significativement les taux de gestation en comparaison aux embryons non supplémentés (18,5% vs. 48,8%, $p < 0,05$) (Sanches et al., 2013). La Forskolin stimule la lipolyse par

l'activation d'enzymes de dégradation des lipides, les lipases. L'activité de lipolyse de la Forskolin a été rapportée chez le porc ainsi que chez les bovins (Men et al., 2006; Panyaboriban et al., 2018). Le resvératrol connu pour ses propriétés antioxydantes est également utilisé pour délipider les embryons. Utilisé à 0.5µM dans le milieu de culture des embryons bovins, il permettrait une réduction du contenu en lipides neutres et une augmentation des taux de survie post congélation lente (68,3 vs. 54,2%, $p < 0,05$) (Abe et al., 2017).

Finalement, les effets bénéfiques sur le développement embryonnaire semblent plus liés à la délipidation des embryons qu'à l'ajout de sources de protéines comme la BSA ou le PVA. L'ajout de ces composés a cependant un avantage important puisqu'ils possèdent des propriétés surfactantes et antioxydantes permettant de faciliter la manipulation des embryons (Hasler, 2010).

3.3.2. Ajout de lipides

Les 3 groupes majeurs d'acides gras sont les acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés pour respectivement zéro, une, ou plusieurs doubles liaisons dans leur chaîne acyle.

Les acides gras poly insaturés sont des acides gras essentiels qui ne peuvent être synthétisés par les mammifères, ils doivent donc obligatoirement être apportés par l'alimentation. En fonction de la proximité de la première double liaison du groupement méthyle terminal, les acides gras poly insaturés sont classés en 3 catégories, les omégas-3 (n-3), les omégas-6 (n-6) et les omégas-9 (n-9) (Figure 9.) (Zarezadeh et al., 2019).

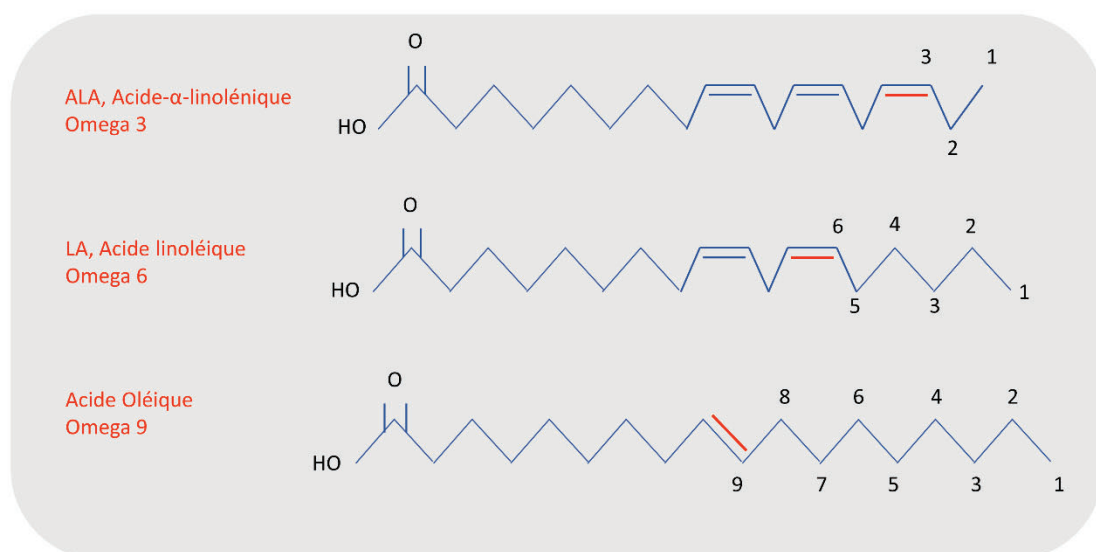


Figure 9. Acides gras poly insaturés de type oméga 3, 6 et 9.

Du fait d'un déficit d'enzymes delta-12 et delta-15-desaturase, les mammifères sont incapables de synthétiser l'acide linoléique (LA ; C18 :2) et l'acide alpha linoléique (ALA ; C18:3) à partir de l'acide stéarique (Figure 10.). Ces acides gras sont donc reconnus comme acides gras essentiels et doivent donc être apportés par l'alimentation. On les retrouve dans les poissons gras, les noix, les graines de lin, de colza et dans les légumes verts. L'ALA peut être converti en oméga-3 de longue chaîne par des réactions successives de désaturation et d'élongation afin d'obtenir de l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6) (Calder, 2012). Au cours de ce processus seul, respectivement 5 et 0,5% des apports en ALA sont convertis en EPA et DHA, et ce, à cause d'une inhibition compétitive de l'enzyme delta-6-desaturase, due à un apport de LA supérieur à l'apport d'ALA (Welch et al., 2010) (Figure 10.).

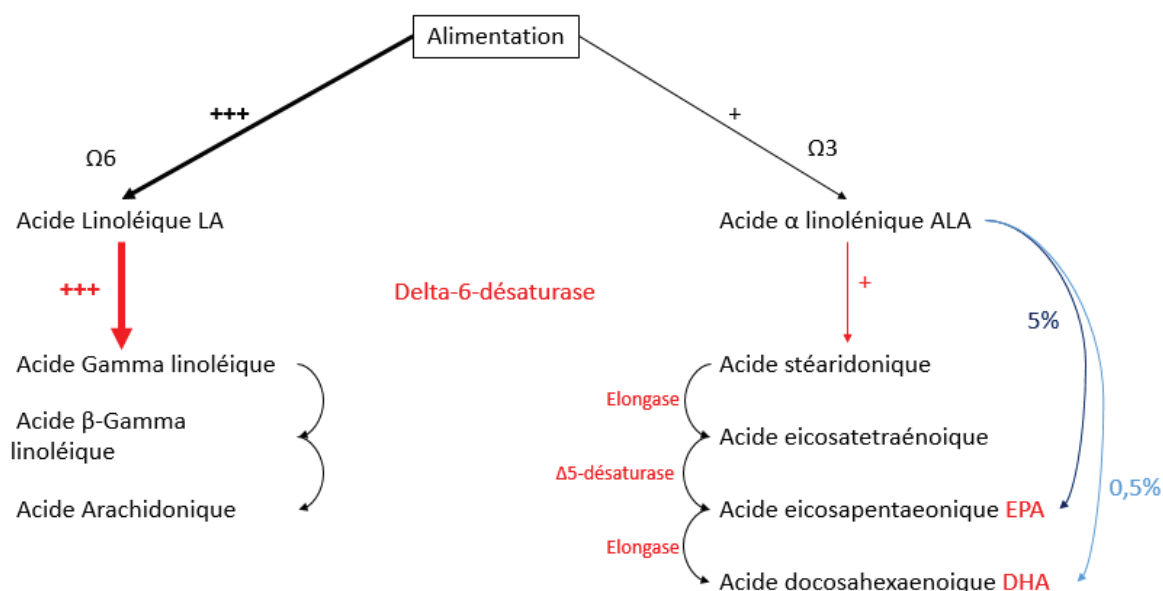


Figure 10. Biosynthèse des acides gras à longues chaînes de types oméga 3 et oméga 6. Adapté de (Calder, 2012) et (Welch et al., 2010).

Les différents acides gras sont présents dans le sang sous forme libre non estérifiée, ou sous forme estérifiée. C'est l'albumine qui prend en charge les acides gras libres pour les diriger vers leurs tissus cibles. L'analyse des acides gras libres montre une corrélation entre ceux retrouvés dans le sang et dans le fluide folliculaire bovin, ce qui signifie que les acides gras plasmatiques diffusent jusque dans le fluide folliculaire bovin (Leroy et al., 2005).

L'acide linoléique (LA) est l'acide gras, de type oméga-6, le plus abondant du fluide folliculaire bovin (30% des acides gras totaux) et il a été précédemment décrit que sa concentration diminue significativement quand la taille du follicule augmente (34,8% des acides gras totaux pour des follicules de 1-3 mm vs. 31,1% pour des follicules de 7-13 mm). L'ajout de LA dans le milieu de maturation des ovocytes entraînerait une diminution de l'expansion du cumulus ainsi qu'une diminution du taux d'ovocytes au stade M2 après 24h de maturation et ce dès l'ajout de 50µM de LA. Remettre les ovocytes dans un milieu de culture exempt de LA pendant 24h permettrait de restaurer le taux d'ovocytes matures. Ceci suggère que le LA a un effet négatif précoce sur l'ovocyte, il influence la méiose et la progression au stade métaphase 2, sa concentration doit donc être régulée (Marei et al., 2010).

Les acides gras polyinsaturés de type oméga-3 ne composent que 2,78% des acides gras du fluide folliculaire bovin lorsque le régime alimentaire des vaches est enrichi en acides gras saturés alors qu'il est de 6,1% après un enrichissement du régime alimentaire en graines de lin et de 3,5% après enrichissement du régime alimentaire en huile de poisson (Moallem et al., 2013). Ainsi le fluide folliculaire contient très peu d'oméga 3 et la majeure partie qui correspond à ces composants lipidiques sont des acide gras libres, des esters de cholestérol, des phospholipides et des triglycérides (Bertevello et al., 2018). Il a également été décrit que plus de 80% des acides gras des COCs bovins seraient des acides gras saturés, cependant les cellules de la granulosa possèdent des taux plus élevés en acides gras mono et polyinsaturés ainsi qu'un ratio n-3 : n-6 plus élevé que ceux retrouvés dans l'ovocyte, suggérant un effet indirect des omégas-3 sur l'ovocyte médié par les cellules de la granulosa (Adamiak et al., 2006).

L'apport en oméga 3 peut se faire directement par l'alimentation des animaux ou bien par l'ajout de lipides dans les milieux de développement *in vitro* et en particulier dans le milieu de maturation où les ovocytes sont entourés de leur cumulus composé des cellules de la granulosa (Elis et al., 2017; Freret et al., 2019a; Oseikria et al., 2016).

Dans ce sens, Marei et al. ont démontré que l'ajout d'ALA dans le milieu de maturation ovocytaire, lorsque la maturation a lieu dans un milieu lipotoxique, permet de récupérer les compétences développementales de l'ovocyte et ce via la restauration des fonctions des cellules de la granulosa plus que par les fonctions de l'ovocyte lui-même (Marei et al., 2017). En effet, l'ajout d'ALA, en conditions lipotoxiques permettrait de réduire l'apoptose des cellules de la granulosa, d'avoir une expansion partielle du cumulus, de normaliser le potentiel membranaire mitochondrial des cellules

de la granulosa mais pas celui de l'ovocyte et enfin de réduire l'expression de molécules de stress du réticulum comme BiP et HSP70.

Il a été démontré que le récepteur des acides gras FFAR4 était localisé à la fois à la surface de l'ovocyte et des cellules du cumulus des COCs bovins (Elis et al., 2017). Il s'avère que les acides gras de type oméga 3, en particulier le DHA, activent ce récepteur (Miyamoto et al., 2016). L'utilisation d'un agoniste synthétique du récepteur, le TUG-891 (1 à 5 μ M), durant la maturation ovocytaire entraînerait une augmentation des taux de blastocytes (39.5% \pm 4.1%, 41.3% \pm 4.1%), et ce de manière identique à l'ajout d'1 μ M de DHA (39.2% \pm 4.1%) en comparaison au contrôle (25.2% \pm 3.6%), $p < 0,05$ (Elis et al., 2017).

L'ajout de lipides et en particulier d'oméga 3 (n-3) directement dans l'alimentation des donneuses s'est révélé être également une piste intéressante pour améliorer la qualité des embryons bovins (Petit and Twagiramungu, 2006). En effet, il a été démontré que l'ajout de 300 à 700g/j d'huile de lin dans l'alimentation de vaches laitières entraînait une augmentation d'acide α -linoléique (ALA, n-3) dans le fluide folliculaire, les cellules de la granulosa et les COCs. La concentration en DHA a été multipliée par 6.7 dans le fluide folliculaire lorsque les vaches étaient supplémentées dans leur alimentation par 300 à 700g/j d'huile de poisson. Bien que le taux d'hormone Antimüllérienne (AMH), marqueur corrélé au nombre de follicule antraux, n'ait pas été mesuré, ces suppléments permettent d'augmenter le nombre de follicules par ovaire en comparaison aux vaches supplémentées en acides gras saturés avec, respectivement 10,7 et 9,6 follicules par ovaire pour celles dont le régime a été enrichi en huile de lin et huile de poisson contre 8 pour celles suivant un régime enrichi en acides gras saturés ($p < 0,05$). Après OPU-FIV, une augmentation du taux de clivage et de blastocyte a été relevé dans les groupes dont le régime a été supplémenté en huile de poisson ou en huile de lin (Moallem et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus par Freret et al., où les auteurs ont démontré que l'ajout d'oméga 3 dans le régime des femelles donneuses était suffisant pour induire une augmentation des taux de blastocystes de bonne qualité (Q1 et Q2) après OPU-FIV (Freret et al., 2019a). Ces résultats montrent que malgré la culture *in vitro* de 7 jours, les différences acquises dans le follicule sont importantes et permettent d'influer la qualité des blastocystes. De plus, une courte supplémentation du régime des femelles donneuses en oméga 3 serait suffisante pour induire un changement dans la composition du fluide folliculaire et dans le profil lipidique des ovocytes, augmentant notamment les concentration en phosphatidylcholine et sphingomyéline, composants majeurs des membranes

(Freret et al., 2019a). L'addition d'oméga 3 dans le régime alimentaire des donneuses permettrait de réduire les taux utérin de prostaglandine F2 α et de ce fait les pertes de gestation (Dirandeh et al., 2013; Mattos et al., 2004). Chez l'Homme, de nombreuses études s'accordent pour dire que des niveaux d'oméga 3 sériques élevés sont associés à une probabilité plus élevée de grossesse et de naissance (Chiu et al., 2018; Koga et al., 2020). Son intérêt en supplémentation alimentaire a également été démontré pour restaurer les dysrégulations d'expression de gènes ovariens après un régime riche en lipides (Hohos et al., 2020). L'abondance relative et la concentration en lipides et acide gras du microenvironnement folliculaire ou du milieu de maturation des ovocytes sont donc associées à la qualité et au développement embryonnaire durant la procédure de PIV. En effet, la supplémentation du milieu de culture des embryons avec du serum de génisses ayant été supplémentées dans leur alimentation en acides gras insaturés permet d'augmenter le taux de blastocystes, le nombre de cellules totales par embryon et de diminuer les niveaux d'apoptose (Marei et al., 2016). Ces résultats laissent penser que l'ajout d'acide gras insaturés de type oméga 3 directement dans les milieux de culture serait favorable au développement embryonnaire. Dans ce sens, des auteurs ont démontré que le DHA, ajouté directement au milieu de maturation *in vitro* des ovocytes à hauteur de 1 μ M permettrait une augmentation des taux de clivage et des taux de blastocystes à J7 (Elis et al., 2017; Oseikria et al., 2016). Ajouté directement dans le milieu de maturation des ovocytes ou dans le régime alimentaire des femelles donneuses, les oméga 3 semblent donc améliorer la production d'embryons.

Messages clés

Pour améliorer la qualité des embryons produits *in vitro*, différentes stratégies peuvent être adoptées :

- 1) Adapter le management des femelles donneuses
 - Moduler l'alimentation des femelles donneuses, notamment l'apport d'acide gras de type oméga 3
 - Adapter les protocoles de superovulation pour qu'ils correspondent à la physiologie des animaux
 - Éviter le stress thermique
- 2) Moduler les conditions de culture *in vitro*
 - Limiter le stress oxydatif
 - o Adapter la tension en oxygène (passer de 20% à 5% d'O₂ en veillant à ajuster les concentrations de glucose)
 - o Utiliser des antioxydants
 - Limiter l'apoptose (anti-apoptotiques)
 - Moduler le profil lipidique des embryons
 - o Délipider les embryons par une privation de source protéique en fin de culture
 - o Remplacer les protéines d'origine animale par des dérivés synthétiques
 - o Ajouter des lipides de type oméga 3 dans le milieu de maturation des ovocytes

Pour optimiser l'efficacité du transfert d'embryons bovins PIV, biopsiés et congelés, il convient également de s'intéresser à l'amélioration des protocoles de cryopréservation connus comme affectant les taux de gestation des embryons produit *in vitro*, en particulier lorsque ces derniers sont biopsiés.

Chapitre 2. Comment améliorer l'efficacité des protocoles de cryoconservation?

La cryoconservation est un moyen de conserver les cellules / tissus / organismes par le froid sur des périodes plus ou moins longues. La descente en température permet de ralentir les réactions chimiques et ainsi de stopper le métabolisme. La cryoprotection se réfère quant à elle à la protection des cellules, tissus, ou organes stockés à long terme après refroidissement à des températures négatives.

De cette manière, chez les bovins, des milliers de veaux naissent chaque année après transfert d'embryons cryoconservés et de millions d'IA utilisant de la semence congelée. Avec l'arrivée de la sélection génomique, le génotypage de l'embryon a été rendu possible. Que l'embryon soit produit *in vivo* ou *in vitro*, lorsqu'il est biopsié pour être génotypé, il doit obligatoirement être congelé dans l'attente de l'obtention des résultats de génotypage (en moyenne 8 jours pour les organismes de sélection). De plus, indépendamment de la stratégie de génotypage retenue, les embryons produits ne sont pas nécessairement transférés tout de suite après leur collecte pour diverses raisons (manque de femelles receveuses disponibles et synchronisées, export...) et doivent nécessairement être congelés pour être valorisés ultérieurement.

1. Principes cryobiologiques

Une cellule vivante est soumise à des réactions chimiques notamment enzymatiques qui dépendent de la température. La vie dépend de la vitesse de ces réactions. Lors du processus de congélation, la baisse de la température engendre une diminution de la vitesse des réactions enzymatiques provoquant l'arrêt du métabolisme. Une réaction enzymatique qui dure une seconde à 27 °C dure environ quatre secondes à 4°C et deux millions d'années à -170 °C. Ainsi, il est admis que cet état de stabilité biologique est atteint autour de -135 °C, température à laquelle toute l'eau atteint un état amorphe (Mazur, 1970).

La congélation est létale pour la majorité des systèmes vivants. En réalité, ce n'est pas le fait d'être stocké à -196°C dans l'azote liquide qui est limitant pour les cellules mais plutôt la transition par une zone intermédiaire, de +15°C à -60°C, que les cellules doivent passer deux fois, une fois lors de la congélation et une fois lors du réchauffement (Mazur, 1970). En effet c'est à ces températures que de nombreux phénomènes se produisent et peuvent être délétères pour la cellule, comme le changement de l'eau en glace et la déshydratation. Certains organismes peuvent survivre à la congélation du fait de la production de molécules cryoprotectrices reprises aujourd'hui pour cryopréserver les cellules/tissus. En effet de nombreux sucres (tréhalose, sucrose, glucose) sont utilisés par une variété d'espèces animales (crustacés, amphibiens, insectes), bactériennes ou végétales pour survivre au processus de congélation ou de déshydratation extrême (Crowe et al., 1992). Par exemple le tardigrade, grâce à la sécrétion de protéines spécifiques (Tardigrade Disordered Proteins) va survivre à : la dessiccation, de très hautes températures, la congélation, des chocs osmotiques, des radiations et au vide (Hesgrove and Boothby, 2020). Ces molécules agissent notamment sur le comportement thermodynamique des solutions lors des changements de température.

1.1. *Changement de phase de l'eau*

L'eau est le seul composé naturel qui se trouve sous 3 formes à la surface de notre planète : liquide, gazeuse et solide (glace) selon la température et la pression. C'est en effet la pression atmosphérique particulière (1013 hPa) qui permet à l'eau liquide et cristallisée de coexister à 0°C.

L'eau liquide est une molécule bipolaire composée de deux atomes d'hydrogène et d'un atome d'oxygène liés par des liaisons covalentes de fortes énergies. Les forces électrostatiques créent des

liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau ou d'autres molécules (sucres, alcools, ions, protéines). Lorsque ces liaisons se font entre molécules d'eau elles confèrent au liquide une viscosité plus importante et donnent naissance à des amas moléculaires (Karow, 2001). Ainsi, la viscosité de l'eau varie en fonction de la température, plus la température augmente plus l'eau devient liquide, à l'inverse plus la température refroidit plus l'eau devient visqueuse.

Bien que 0°C soit communément appelé le « point de congélation » (FP : freezing point) de l'eau pure à pression atmosphérique, la cristallisation est en fait initiée à une température bien plus basse. Il est essentiel de comprendre que 0°C est un « point de congélation d'équilibre », température à laquelle les cristaux de glace et l'eau coexistent en équilibre (Karow, 2001). Lors de la descente en température, l'eau cellulaire se trouve dans un état instable : la surfusion qui est l'état d'une matière qui demeure en phase liquide alors que sa température est plus basse que son point de congélation. C'est un état dit métastable, c'est-à-dire qu'une petite perturbation peut suffire pour déclencher subitement le changement vers la phase solide (présence d'impuretés, chocs physiques ou thermiques). Ce changement de phase entraîne alors une augmentation de la température jusqu'au point de solidification (réaction exothermique). Lorsque la cristallisation commence, la chaleur latente de fusion libérée (334 J/g) provoque une augmentation de la température jusqu'au point de congélation d'équilibre 0°C. La température reste à 0°C tant que toute l'eau n'est pas changée en glace (Karow, 2001). Lorsqu'un échantillon biologique est refroidi à des températures inférieures à son point de fusion d'équilibre, de la glace se forme dans le liquide extracellulaire soit spontanément, en raison de la rupture de l'état métastable de la solution en surfusion, soit par une nucléation forcée appelée « seeding », réalisée généralement en touchant l'échantillon avec un objet plongé préalablement dans l'azote liquide. Cette glace extracellulaire joue un rôle majeur dans la réponse biophysique des cellules au processus de cryoconservation, car elle modifie l'environnement chimique des cellules, les contraint en les déformant mécaniquement et peut induire la formation de glace intracellulaire délétère pour les organelles (Karlsson and Toner, 1996; Karlsson et al., 1993).

1.2. *Cristallisation/nucléation*

A l'état liquide, les molécules d'eau sont en perpétuel mouvement, de nombreuses liaisons hydrogènes se créent et se cassent entre elles. Lorsque la température s'abaisse (en dessous de 0°C), l'énergie disponible est moins importante, la cinétique est ralentie et les molécules forment

de petits réseaux. Dans l'eau pure en surfusion, ces réseaux se forment et se dissipent très rapidement. Cependant s'ils atteignent une taille suffisamment importante, dite critique, qui correspond à un rayon particulier, ils deviennent énergétiquement favorables à ce que d'autres molécules s'ajoutent à la structure dont la taille, par conséquent, augmente (Karow, 2001). Ce phénomène est appelé nucléation dans le sens où la cristallisation nécessite la présence de « noyaux » ou germes permettant la croissance des cristaux de glace dès lors que la barrière énergétique est levée : on parle d'énergie d'activation. Ce rayon critique diminue à mesure que la viscosité et la surfusion augmentent (Karlsson and Toner, 1996; Karow, 2001). La croissance des cristaux débute à partir du noyau de nucléation puis par échange constant de molécules entre la glace et l'eau. Ces échanges vont dépendre de la viscosité de la solution. Plus celle-ci sera élevée, plus la diffusion sera freinée et donc la croissance des cristaux ralentie. Or, la viscosité des solutions aqueuses augmente lorsque la température baisse. Ainsi, lorsque la température baisse, la vitesse de croissance des cristaux augmente tout d'abord avant de diminuer du fait de l'augmentation de viscosité. Si l'eau pure est refroidie à une vitesse extrêmement rapide, la solution atteindra une température qui empêche thermodynamiquement le réarrangement des molécule d'eau en cristaux de glace et un solide amorphe se formera, on parle alors de verre. Cette température est la température de transition vitreuse (Karow, 2001).

Dans la mesure où la formation de glace peut se produire à n'importe quelle température en dessous du point de congélation d'équilibre mais au-dessus de la température de transition vitreuse, la quantité totale de glace formée pendant la congélation peut être modulée en contrôlant la vitesse de refroidissement de la solution entre ces deux points (Karlsson and Toner, 1996). Donc en utilisant des vitesses de refroidissement très élevées, la quantité de glace qui se forme avant que la T°C de transition vitreuse ne soit atteinte peut être considérablement réduite, c'est le principe de la vitrification.

1.3. *Vitesse de refroidissement*

1.3.1. *Congélation et vitesse faible*

Lorsque le refroidissement est lent, la cristallisation se produit d'abord dans le milieu extracellulaire (Karlsson and Toner, 1996). Les cristaux de glace en formation excluent les solutés qui se retrouvent alors dans un volume de plus en plus petit d'eau à mesure que la cristallisation progresse. L'eau libre va alors diffuser à travers la membrane cellulaire du milieu le moins concentré

dit hypotonique vers le plus concentré dit hypertonique jusqu'à atteindre « l'équilibre osmotique », correspondant au moment où les concentrations en solutés sont identiques dans les milieux qui sont alors isotoniques. Si le milieu hypertonique est le milieu extracellulaire, la cellule va se déshydrater et son volume va diminuer : ce phénomène est appelé « plasmolyse » et il peut être fatal s'il est trop important. Au contraire si le milieu extracellulaire est hypotonique, la cellule va connaître un afflux d'eau à l'origine d'une augmentation de volume et de tensions mécaniques sur la membrane qui finit par se rompre.

La concentration du milieu extracellulaire augmente jusqu'à devenir hypertonique, la cellule se déshydrate (Mazur, 1963).

Cette déshydratation présente deux avantages :

- Le volume d'eau libre étant plus faible en intracellulaire, la cristallisation a moins de probabilité d'y débiter (Mazur, 1970).
- La concentration en solutés augmente et diminue le point de congélation, facilitant la surfusion (Karlsson and Toner, 1996).

En théorie pour avoir le moins de formation de glace intracellulaire il faudrait avoir une déshydratation maximale. Or lorsque la concentration intracellulaire en électrolytes devient trop élevée, elle provoque des modifications biochimiques délétères pour la cellule regroupées sous le terme « d'effet solution » (Mazur, 1970). Les conséquences de cet effet seront d'autant plus marquées si la concentration intracellulaire est élevée et si la durée d'exposition est longue. Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer les dommages engendrés par l'effet solution.

Lovelock (1953) a proposé que l'augmentation de la concentration en solutés et la déshydratation de la cellule seraient les principales causes de destruction des cellules lors de la descente en température (Lovelock, 1953a, 1953b), entraînant une dénaturation des lipoprotéines membranaires. Celle-ci engendrerait la formation de pores dans les membranes, les fragilisant et augmentant ainsi les pertes en lipides et phospholipides. La cellule est rendue de ce fait perméable aux électrolytes extracellulaires et l'afflux de ces électrolytes pourraient aboutir à une rupture membranaire (Leibo, 1986).

Karow et Webb (1965) ont expliqué que la déshydratation entraîne une perte d'eau, auparavant liée aux structures cellulaires, dénudant ainsi des protéines agencées et liées à ces mêmes molécules d'eau qui sont pour autant essentielles à l'intégrité cellulaire (Karow and Webb, 1965).

1.3.2. Vitrifaction et vitesse élevées

La vitrification est un refroidissement intense et rapide d'un liquide visqueux vers sa forme vitreuse. Lors de la transition vitreuse, la viscosité est suffisamment élevée pour empêcher efficacement la diffusion moléculaire, arrêtant ainsi toutes les transitions de phase : la solution non cristallisée reste dans un état métastable, avec une structure amorphe, non cristalline (Karlsson and Toner, 1996). On parle de vitrification lorsque la fraction totale de l'échantillon qui cristallise reste en dessous de 10^{-6} % (Uhlmann, 1972). Pour éviter la formation de cristaux de glace, un très faible volume de solution de vitrification à haute concentration en agents cryoprotecteurs ainsi que des vitesses élevées de descente en température et réchauffement sont indispensables. Ces conditions réunies permettent aux échantillons d'être soumis aux températures de transition de phase lipidique membranaire sur des temps trop courts pour que des dommages se produisent (Vajta and Kuwayama, 2006). Des concentrations accrues de solutés ou de polymères cryoprotecteurs augmentent la viscosité de la solution, réduisant ainsi les taux de nucléation et la croissance des cristaux de glace, permettant à la vitrification de se produire à des vitesses de refroidissement plus faibles (Karlsson and Toner, 1996).

1.4. Effets biologiques de la descente en température

Les cellules sont soumises à une gamme de forces thermiques, chimiques et mécaniques pendant la cryoconservation, qui peuvent affecter profondément leurs fonctions biologiques. Bien que l'arrêt des réactions métaboliques soit bénéfique pour le stockage à long terme des biomatériaux, les processus de congélation et de décongélation sont souvent délétères. La gravité des dommages dépend de plusieurs facteurs tels que la taille et la forme des cellules, la qualité et la sensibilité des embryons, la capacité de perméabilité des membranes. La survie cellulaire est très faible lorsque les vitesses de congélation sont très faibles et très rapides, un taux de survie optimal existe à vitesse intermédiaire de congélation ou à des vitesses extrêmement hautes. Même si la courbe de descente en température peut varier en fonction du type cellulaire, du milieu de congélation utilisé, ce comportement semble être universel (Figure 11.).

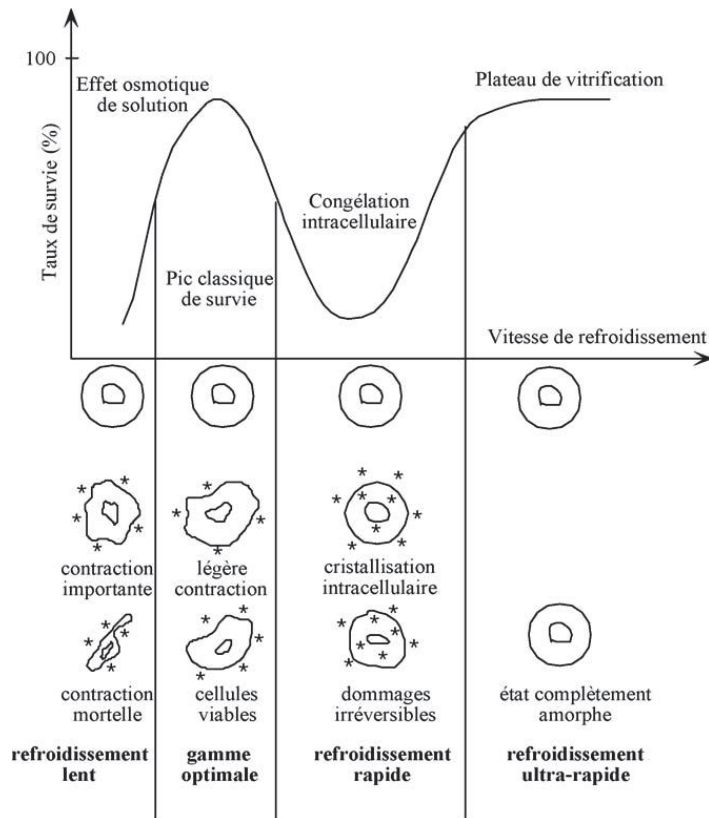


Figure 11. Impact de la vitesse de refroidissement sur le taux de survie des cellules après leur décongélation, tiré de (Courbière et al., 2009)

Deux mécanismes indépendants de dommages cellulaires surviendraient lors de la congélation, l'un à des vitesses de refroidissement lentes et l'autre à des vitesses élevées (hors vitrification) (Figure 11.). Les lésions cellulaires attribuées à des vitesses de refroidissement rapides sont majoritairement la formation de cristaux de glace intracellulaire et la rupture de la membrane plasmique due aux flux osmotiques. A des vitesses plus lentes de congélation, les risques majeurs sont l'exposition à de fortes concentrations de solutés en intra et extra cellulaire appelé « effet solution » et les interactions physiques entre les cellules et les cristaux extracellulaires (Muldrew and McGann, 1990, 1994). La formation de glace extracellulaire favorise la cristallisation intracellulaire, en effet, elle se produit quand 88 à 94% de l'eau extracellulaire est congelée (Mazur et al., 2005). La présence de cristaux intracellulaires est associée à la perte de capacité de la membrane plasmique à empêcher les cristaux de glace en croissance de pénétrer dans le cytoplasme (Mazur, 1970; Muldrew and McGann, 1990). La déformation membranaire occasionnée par la glace extracellulaire pourrait entraîner des changements structuraux des pores membranaires facilitant ainsi la propagation de glace. Lorsqu'elle atteint un certain seuil, la

déshydratation peut être irréversible, elle entraîne des changements dans l'organisation des lipides membranaires, ces derniers formant des hexagones inversés avec leurs têtes hydrophiles rendant la membrane semi-perméable, facilitant le passage de l'eau et pouvant même entraîner sa rupture (Wolfe and Bryant, 2001). Lorsque l'échantillon est refroidi suffisamment rapidement (10-1000°C/s), ou que la déshydratation du cytoplasme est suffisamment élevée mais non délétère, on observe une augmentation de la viscosité du cytoplasme permettant la transition vitreuse (Wolfe and Bryant, 2001). Il a également été démontré que le processus de congélation et décongélation entraînait une diminution du contenu en ATP. En effet la cryoconservation conduit à un dysfonctionnement mitochondrial qui se traduit par un gonflement des mitochondries ou encore par des dommages membranaires (Hayashi et al., 2019).

1.5. *Agents cryoprotecteurs*

C'est en 1949 que Polge a découvert, par hasard, que l'addition de glycérol aux milieux de congélation des spermatozoïdes augmentait considérablement leur taux de survie lorsqu'ils étaient congelés à -79°C (Arav, 2014), ouvrant alors la voie à la démocratisation de l'insémination animale. Si les actions des cryoprotecteurs ne sont pas totalement comprises à ce jour, on sait qu'ils diminuent les altérations cellulaires engendrées par le changement de phase de l'eau. Ils protègent les cellules contre la formation de glace intracellulaire, contre l'effet solution mais aussi contre la cristallisation lors du réchauffement.

Il existe 2 grandes familles de cryoprotecteurs : les cryoprotecteurs intracellulaires que l'on appelle aussi pénétrants et les cryoprotecteurs extracellulaires, non pénétrants. Les cryoprotecteurs vont limiter la vitesse de croissance des cristaux de glace et affecter leur forme (Fukou et al., 2012).

1.5.1. *Les cryoprotecteurs intracellulaires*

Les cryoprotecteurs intracellulaires sont des solvants organiques de faibles poids moléculaires dérivés pour la plupart d'alcool (glycérol, éthanol, méthanol) ou du diméthyl sulfoxyde (DMSO). En pénétrant dans les cellules ils permettent de rétablir l'équilibre osmotique modifié par la sortie d'eau des cellules. En remplaçant cette eau ils permettent de limiter la quantité intracellulaire de glace formée et le phénomène de déshydratation, protégeant ainsi les cellules (Wolfe and Bryant, 2001). De plus leur fixation aux molécules d'eaux, permettrait de diminuer la

mobilité des molécules d'eau augmentant alors la viscosité de la solution et de la température de nucléation. En effet, plus la concentration en cryoprotecteur augmente, moins il y a d'eau disponible et la quantité de glace formée est d'autant plus faible. Les cryoprotecteurs intracellulaires limitent également l'effet solution permettant une augmentation de la cryosurvie post décongélation (Mazur, 1970). Leurs degrés de pénétration varient en fonction de la température et du type cellulaire. Par exemple, après maturation ovocytaire, la perméabilité des ovocytes au DMSO et à l'éthylène glycol (EG) est augmentée (Agca et al., 1998). Les cryoprotecteurs intracellulaires auraient tous des propriétés antioxydantes. Le DMSO est considéré comme le plus antioxydant des cryoprotecteurs intracellulaires tandis que le glycérol serait celui ayant le moins cette propriété (Best, 2015). Mais le DMSO pourrait également être pro-oxydant, notamment en affectant les fonctions thiol des protéines, indispensables à leur bon fonctionnement. Cette propriété pro-oxydante diminuerait à mesure que la température diminue (Best, 2015; Sanmartín-Suárez et al., 2011).

1.5.2. Les cryoprotecteurs extracellulaires

Les cryoprotecteurs extracellulaires sont des sucres (sucrose, tréhalose, mannitol etc.) ou des polymères de haut poids moléculaires, non pénétrants (Dextran, polyvinylpyrrolidone, polyéthylène glycol, poloxamer etc.). Ils entraînent une sortie d'eau de la cellule et produisent une surconcentration intracellulaire en soluté qui limite la cristallisation. La majorité des protocoles de congélation lente et vitrification en contiennent. Ils permettent de maintenir l'intégrité des protéines membranaires et protègent les lipides d'une augmentation de la température de transition de phase durant la descente en température (Crowe and Crowe, 1988; Oliver et al., 2002). Ils permettraient également, lors du processus de décongélation, d'éviter de fortes variations du volume cellulaire. En effet lorsque le milieu extracellulaire se réchauffe, la cellule augmente brutalement de volume à la suite d'une entrée d'eau et au retrait des cryoprotecteurs. La présence de sucres limite ces variations de volume en exerçant une pression osmotique permettant de ralentir l'entrée d'eau dans la cellule. Ils seraient relativement peu toxiques même à haute concentration.

Les bénéfices de l'ajout de tréhalose dans le milieu de congélation des cellules de mammifères et en particulier de l'ovocyte ont déjà été démontrés (Eroglu et al., 2009). Cependant, la notion de cryoprotecteurs non pénétrants n'est pas si claire que cela puisqu'il a été montré que durant la

descente en température, la perméabilité membranaire est affectée à la fois par le processus de congélation et par les cryoprotecteurs. Cette augmentation de la perméabilité entraînerait une absorption de molécules non perméables comme le tréhalose (Zhang et al., 2016). L'absorption de ces disaccharides durant le protocole de congélation entraînerait une protection intracellulaire en stabilisant les membranes (Zhang et al., 2017) et en réduisant les dommages à l'ADN durant le stockage des échantillons (Oldenhof et al., 2017). Cependant le tréhalose piégé en intracellulaire lors du processus de congélation pourrait causer un choc osmotique à la décongélation des cellules. Il est alors préconisé de réduire petit à petit la concentration de tréhalose post décongélation (Zhang et al., 2016).

1.5.3. Toxicité des cryoprotecteurs

L'apport des cryoprotecteurs n'est bénéfique que dans certaines conditions d'utilisation, le contrôle de leur concentration et le temps pendant lequel les cellules y sont exposées.

La toxicité biochimique est un facteur intrinsèque à chaque cryoprotecteur mais variable d'un type cellulaire à l'autre. Elle dépend de la concentration utilisée et du temps d'exposition à ce dernier ; la toxicité diminuant lorsque la température baisse. Celle-ci résulterait d'effets sur l'environnement cellulaire (modification des constantes diélectriques, des tensions superficielles, des équilibres ioniques et du pH...) et d'interactions directes entre le cryoprotecteur et les constituants cellulaires, particulièrement les protéines (enzymes, microtubules) et les membranes cellulaires en perturbant la perméabilité membranaire, les pompes ioniques et l'ADN (Best, 2015). Il est possible de diminuer cette toxicité en incorporant un mélange de plusieurs cryoprotecteurs permettant de réduire la concentration propre de chaque cryoprotecteur et de bénéficier de la synergie de certaines associations (Ali and Shelton, 1993). Par exemple, le formamide, réputé comme le cryoprotecteur le plus toxique, le serait moins en combinaison avec le DMSO (Fahy et al., 1995). Utilisés seuls, le DMSO ou l'EG à 1,5 M permettraient une meilleure survie des ovocytes de souris, que le propylène glycol (PG). Cependant, lorsque le DMSO est combiné au PG, sa toxicité est fortement diminuée augmentant les taux de survie des ovocytes (Szurek and Eroglu, 2011). Les sucres, par leur liaison avec le feuillet externe de la bicouche phospholipidique membranaire, forment une barrière contre les molécules de cryoprotecteurs qui accèderaient ainsi moins facilement à la membrane.

La toxicité osmotique se manifeste lors de l'ajout et du retrait du cryoprotecteur. En effet, lors de l'exposition à un cryoprotecteur, la cellule se déshydrate et se contracte car le milieu extracellulaire est hypertonique et la perméabilité membranaire à l'eau supérieure à celle des cryoprotecteurs. C'est seulement lorsque les molécules de cryoprotecteur pénètrent la cellule que la contraction cellulaire s'arrête. Or, les cellules seraient capables de se contracter jusqu'à 30-35 % de leur volume initial sans impact sur leur survie (Meryman, 1968). Si la concentration en cryoprotecteur du milieu de congélation est trop élevée et la perméabilité membranaire du cryoprotecteur trop faible, la contraction osmotique peut être trop importante et irréversible. Les mêmes principes s'appliquent lors du retrait des cryoprotecteurs : les cellules sont exposées à une solution hypotonique par rapport au contenu intracellulaire et voient leur volume augmenter très rapidement, parfois jusqu'à l'éclatement. De cette manière, plus un cryoprotecteur pénétrant diffuse facilement, moins il générera de stress osmotique. La perméabilité cellulaire des modèles utilisés est donc à prendre en compte dans le choix du cryoprotecteur. Par exemple, lorsque les ovocytes porcins sont cryopréservés avec du PG les résultats de cryosurvie sont supérieurs à ceux obtenus avec de l'EG, du fait que le PG a une plus forte perméabilité et entraînerait moins de dommages osmotiques aux membranes. Cependant, lorsque les ovocytes sont cryopréservés avec de l'EG, leurs compétences développementales post décongélation sont meilleures que lorsqu'ils sont cryopréservés avec du PG, suggérant un effet toxique du PG (Somfai et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus avec des ovocytes bovins. En effet, lorsque les ovocytes étaient congelés avec du PG, les taux de cryosurvie étaient inférieurs à ceux obtenus avec de l'EG (58% vs. 50%). De la même manière, les taux de gestation étaient supérieurs lorsque les ovocytes étaient congelés avec de l'EG (74% vs. 40%) (Suzuki et al., 1993).

Certains effets toxiques affectés aux cryoprotecteurs sont en réalité dus au fait que la membrane cellulaire est endommagée, que la fonction enzymatique est affectée, que le développement de la cellule ou de l'embryon est moindre, que la fonction mitochondriale est affectée ou encore que des macromolécules comme les protéines ou l'ADN sont endommagées. Si ces dommages sont présents les cryoprotecteurs seront davantage toxiques pour les cellules (Best, 2015).

Il existe donc un optimum à trouver pour une cryoconservation efficace de chaque type cellulaire, combinant à la fois la composition du milieu de cryoconservation et les cinétiques de refroidissement/réchauffement.

2. Cryoconservation des embryons bovins

L'embryon, en fonction de son stade de développement, va développer des caractéristiques qui sont à prendre en compte lorsque l'on souhaite le cryopréserver. L'embryon bovin est composé d'un ensemble de cellules, qui vont plus ou moins adhérer entre elles en fonction du stade de développement, entouré d'une zone pellucide. La cryosurvie de l'embryon, à l'inverse de l'ovocyte, ne va donc pas dépendre d'une seule cellule unique mais d'un ensemble de cellules aux caractéristiques diverses. Ainsi, lors de la congélation du blastocyste, les cellules de la MCI ne vont pas être exposées de la même manière que les cellules du trophoctoderme au milieu de cryoconservation. De plus, le blastocœle, vaste cavité remplie de liquide blastocoelique se développant dès le stade blastocyste représente un lieu propice à la formation de cristaux de glace. L'enjeu de la cryopréservation de l'embryon au stade blastocyste est donc la préservation de ces différents types cellulaires, en prenant en compte la structure 3D complexe de l'embryon.

2.1. *Etat de l'art des méthodes de cryopréservation des embryons bovins*

Différents protocoles de congélation lente et vitrification ont été testés sur l'embryon bovin jouant à la fois sur la nature et la concentration en cryoprotecteurs mais également sur la cinétique de refroidissement et de réchauffement. Les tableaux suivants présentent de façon synthétique l'ensemble des essais menés (Tableau 1, Tableau 2).

En congélation lente, il semblerait que l'EG et le sucrose soient les cryoprotecteurs les plus couramment utilisés et associés pour la congélation de l'embryon bovin. En moyenne 80% des embryons bovins seraient congelés avec de l'EG comme cryoprotecteur (Hasler, 2003). L'EG est un cryoprotecteur qui a un fort potentiel pénétrant et qui est peu toxique permettant une augmentation des taux de cryosurvie, mais également le transfert direct des embryons sans retrait préalable du cryoprotecteur (Voelkel and Hu, 1992). Il est régulièrement utilisé à des concentrations variant de 1,5 à 1,8M (Tableau 1).

Tableau 1. Listes de protocoles de congélation lente d'embryons bovins PIV couramment utilisés dans la littérature

Auteurs	Milieu de congélation	Equilibration	Descente en T°C	Réchauffement	Résultats
(Hasler et al., 1995)	10% Glycérol + 0,4% BSA	15 min	<ul style="list-style-type: none"> -32°C, 0,6°C/min 	Air libre 10s Bain marie 35°C jusqu'à fonte total des cristaux Bains successifs (6.6, 3.3, 0% de Glycérol + 0.3M sucrose)	42% de gestation après transfert
(Martínez et al., 2002)	<ul style="list-style-type: none"> 5% Glycérol + 10% FCS + 1% AA 10% Glycérol + 10% FCS + 1% AA 	5 min pour chaque milieu de congélation	<ul style="list-style-type: none"> -6°C 5 min Seeding -6°C 10 min -32°C, 0,5°C/min 	Air libre 10s Bain marie 22°C 20s Bains successifs (6, 3, 0% de Glycérol + 0.3M sucrose, 10% FCS, 1% AA)	20% de gestation 40.4% de mise bas
	10% Glycérol + 10% FCS + 1% AA	5 min	<ul style="list-style-type: none"> -6°C 5 min Seeding -6°C 10 min -32°C, 0,5°C/min 	Air libre 10s Bain marie 22°C 20s Bains successifs (6, 3, 0% de Glycérol + 0.3M sucrose, 10% FCS, 1% AA)	38% de gestation 36.9% de mise bas
	1,5M EG + 10% FCS + 1% AA	20 min	<ul style="list-style-type: none"> -6°C 1 min Seeding -6°C 5 min -35°C, 0,6°C/min 	Air libre 10s Bain marie 35°C 20s	38% de gestation 44.3% de mise bas
(Assumpção et al., 2008)	1,5M EG + 0,4% BSA	10 min	<ul style="list-style-type: none"> -7°C Seeding -7°C 10 min -31°C, 0,5°C/min 	Air libre 10s Bain marie 25°C 10s	53,5% d'éclosion à 72h
(Bruyère et al., 2012a)	1,5M EG + 0,1M sucrose avec ajout de : <ul style="list-style-type: none"> 20% CRYO3 20 % SVF 4g/L BSA 	10 min	<ul style="list-style-type: none"> -7°C 5 min Seeding -7°C 10 min -32°C 0,5°C/min 	Air libre 10s Bain marie 20°C 20s	CRYO3 Survie 81,5% Éclosion 61,1% <hr/> SVF Survie 58% Éclosion 36% <hr/> BSA Survie 42,2% Éclosion 31,1%
(Takahashi et al., 2013)	1,5M EG + 0,1M sucrose + 0.4mg/mL BSA	15-20 min	<ul style="list-style-type: none"> -7°C Seeding -7°C 10 min -30°C 0,3°C/min 	Bain marie 30°C 20s	36,4% de survie à 48h
(Gumber, 2014)	1,5M EG + 0,1M sucrose + 0,4% BSA	10 min	<ul style="list-style-type: none"> 2 min Seeding -36.5°C, 0.5°C/min 	Bain marie 30°C	61,5% de survie à 24h
(Gumber, 2014)	10% Glycérol + 0,4% BSA + 0,1M Sucrose	10 min	<ul style="list-style-type: none"> 2 min Seeding -36.5, 0.5°C/min 	Bain marie 30°C	66,7% survie à 24h
(Inaba et al., 2016)	1,5M EG + 0,1M sucrose + 4mg/ml BSA + 20% SVF	15-20 min	<ul style="list-style-type: none"> -7°C Seeding 7°C 10 min -30°C, 0,3°C/min 	Air libre 10s Bain marie 30°C 20s	50% de ré-expansion à 24h
(Do et al., 2017)	1,5M EG + 0,4% BSA	10 min	<ul style="list-style-type: none"> -6°C 2 min Seeding -32°C, 0.5°C/min 	Air libre 10s Bain marie 37°C 30s	73.8% d'éclosion à 48h

La combinaison d'un cryoprotecteur pénétrant avec un non pénétrant pour la congélation de blastocystes bovins permet une augmentation des taux de cryosurvie et de gestation (Martínez et al., 2002). En effet, lorsque des blastocystes expansés sont congelés avec un milieu contenant 1,5 M d'EG additionné de 0,1 M de sucrose, les taux de gestation après transfert direct sont supérieurs au témoin, soit respectivement 48,1% vs. 29,6% (Martínez et al., 2002).

Les protocoles de vitrification nécessitent un savoir-faire technique pointu et un équipement spécial et ne sont pas adaptés aujourd'hui aux conditions de terrain du fait de l'impossibilité de réaliser du transfert direct (en ferme ou en station). En effet, la vitrification nécessite l'utilisation de cryoprotecteurs à haute concentration ce qui rend les temps d'incubation courts (de l'ordre de 30s) pour limiter la toxicité et la déshydratation. Elle nécessite également la manipulation des embryons de manière individuelle, alors qu'ils peuvent être manipulés en pool pour la congélation lente, dans des micro-volumes (de l'ordre du μL), ce qui demande une grande dextérité. Les protocoles les plus couramment utilisés dans la littérature pour la vitrification de l'embryon bovin sont des protocoles combinant, comme pour les protocoles de congélation lente, un ou plusieurs cryoprotecteurs pénétrants et un non pénétrant. En effet, l'ajout d'un cryoprotecteur non pénétrant permet l'augmentation des taux de cryosurvie. Par exemple lorsque l'EG est combiné au tréhalose, une augmentation des taux de cryosurvie (52,9 vs. 75%) et d'éclosion (19,6 vs. 42,5%) est observée (Saha et al., 1996). Concernant les associations de cryoprotecteurs, l'EG couplé au DMSO et au sucrose (EGDMSO) semble être une meilleure option que l'utilisation du propanediol (PrOH) couplé au sucrose pour la vitrification de l'ovocyte bovin puisqu'elle permettrait d'augmenter les taux de clivage et de développement en comparaison au PrOH (Marques et al., 2018). L'utilisation de PrOH entraînerait une diminution de la composition en acide arachidonique, jouant un rôle dans la maturation ovocytaire, la fécondation et le développement implantatoire (Nuttinck et al., 2017). La diminution de du contenu en acide arachidonique pourrait expliquer la diminution du taux de clivage et de développement lorsque les ovocytes bovins sont vitrifiés en présence de PrOH. Le protocole le plus couramment utilisé pour la vitrification de l'embryon bovin combine une phase d'équilibration où les embryons sont plongés 3 minutes dans une solution à 7,5% d'EG et 7,5% de DMSO, et une phase courte de vitrification, de l'ordre de 30s, où les embryons sont mis en présence de fortes concentrations de cryoprotecteurs avec, en moyenne entre 15 et 20% d'EG et de DMSO avec 0,5 M de sucrose. Ce protocole permet l'obtention de très bons résultats de cryosurvie post dévitrification (Tableau 2).

Cependant la vitrification, malgré qu'elle permette l'obtention de résultats de cryosurvie satisfaisants, peut altérer les blastocystes bovins en entraînant des dommages membranaires et de la fragmentation de l'ADN (Inaba et al., 2016).

Tableau 2. Listes de protocoles de vitrification d'embryons bovins PIV couramment utilisés dans la littérature

Auteurs	Equilibration	Vitrification	Réchauffement	Résultats
(Vajta et al., 1997)	60s, 22°C 12,5% EG + 12,5% DMSO + 20% SVF	60s, 4°C 25% EG + 25% DMSO	Bain marie 22°C 8s TCM-Hepes 22° + 20% CS	35% de ré-expansion à 24h
(Huang, 2007)	5 min, T°C ambiante 7,5% EG + 7,5% PG	45-60s T°C ambiante 15% EG + 15% PG + 0,5M Sucrose	1 min 37°C 1M sucrose 37°C 3 min 0,5M sucrose 0,25M sucrose	61,7% d'éclosion
(Pereira and Marques, 2008)	T°C ambiante • 5 min 100% GLY • 5 min 10% GLY + 20% EG	30s T°C ambiante 25% GLY + 25% EG + 20% NBCS	5 s air ambiant Bain marie 22°C 15s PBS + 20% NBC 10 min	68,6% de ré-expansion à 24h
(Trigal et al., 2013)	3 min 30°C 7,5% EG + 7,5% DMSO + 20% SVF	20-25s 30°C Fibre plug 16,5% EG + 16,5% DMSO + 0,5M sucrose + 20% SVF	1 min 0,25M sucrose 5 min 0,15M sucrose	44,4% d'éclosion
(Sanchez et al., 2013)	1 min T°C ambiante 10% EG + 10% DMSO	20s T°C ambiante Cryotop 20% EG + 20% DMSO + 0,5M Sucrose	4s air libre Bain marie 1min 35°C 5 min 0,3M sucrose 0,15M sucrose	Ré-expansion 79,2% Éclosion 63,3% Gestation 18,5%
(Caamaño et al., 2015)	3 min 30°C 7,5% EG + 7,5% DMSO + 20% SVF	20-25s 30°C Fibre plug 16,5% EG + 16,5% DMSO + 0,5M sucrose	5 min 41 °C 0,25M sucrose 0,15M sucrose	Éclosion 64,7%
(Pero et al., 2018)	3 min 7,5% EG + 7,5% DMSO + 20% SVF	20-25s Cryotop 16,5% EG + 16,5% DMSO + 0,5M sucrose	1 min 0,25M sucrose 5 min 0,15M sucrose	Survie 51,1% Ré-expansion 38,5% Éclosion 17,6%
(Do et al., 2017, 2018)	3 min 37°C 7,5% EG + 7,5% DMSO + 1% BSA	1 min 37°C 15% DMSO, 15% EG, 0,5M sucrose	5 min 0,5M sucrose 0,3M sucrose 0,2M sucrose	Ré-expansion 96,1% Éclosion 90,2% Gestation à 90j 40%

La vitrification affecte également les embryons de manière différentielle en fonction de leur condition de production (*in vivo* ou *in vitro*). En effet, lorsque des embryons bovins sont produits *in vivo* et vitrifiés, une augmentation de l'expression de gènes de la pluripotence (Pou5f1 et Nanog)

est mise en évidence, alors que l'inverse est observé pour les embryons produits *in vitro* et vitrifiés (Sehati et al., 2019) ou congelés (Mori et al., 2015). Des résultats similaires ont été obtenus précédemment sur blastocystes murins produits *in vivo*, où il a été mis en évidence que la vitrification entraînait une diminution significative des niveaux de méthylation d'Oct4 (85% vs. 62,5%) et Nanog (77,5% vs. 55%) ce qui est corrélé avec une augmentation de l'expression de ces gènes (Zhao et al., 2012).

2.2. *Amélioration des protocoles de cryopréservation*

La plupart des milieux de manipulation, de conservation et de cryoconservation des embryons bovins disponibles dans le commerce contiennent des produits d'origine animale, tels que du SVF ou de la BSA (Bettencourt et al., 2009; Hasler, 2010; Zander-Fox et al., 2013). Il semblerait que la présence de ces composés dans les milieux de congélation des embryons soit liée à leurs propriétés surfactantes et antioxydantes. En effet, ajoutés aux milieux de congélation/vitrification, ils permettraient de faciliter la manipulation des embryons en réduisant la tension superficielle du milieu et seraient des chélateurs de métaux lourds (Hasler, 2010). Malgré ces quelques avantages à l'utilisation du SVF et de la BSA, leur composition n'est pas stable et varie d'un lot à l'autre, ne permettant pas de garantir la reproductibilité des résultats. L'enjeu est donc de limiter la toxicité des cryoprotecteurs, la formation de cristaux de glace et de trouver des substituts aux protéines d'origines animales, permettant l'obtention de résultats de cryosurvie élevés.

Différents composés synthétiques ont fait l'objet d'études comme le CRYO3, un milieu breveté sans sérum, sans protéines et sans dextrane. Le CRYO3 ajouté à hauteur de 20% dans le milieu de congélation lente des embryons bovins PIV, permettrait l'augmentation des taux de cryosurvie (81,5% vs. 58,0 et 42,2%) et d'éclosion (61,1% vs. 31,1 et 36,0%) post-décongélation en comparaison au témoin contenant du sérum ou de la BSA (Bruyère et al., 2012a). Utilisé en vitrification sur de l'embryon de lapin, le CRYO3, à hauteur de 20% dans le milieu de vitrification permettrait d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec 0,4g/L de BSA à la place du CRYO3, suggérant que le CRYO3 permettrait de remplacer les dérivés de produits animaux dans les milieux de vitrification (Teixeira et al., 2018). Lorsque des embryons bovins sont cultivés de J0 à J6 dans un milieu sans sérum puis congelés lentement ou vitrifiés avec un milieu synthétique additionné de 20% de CRYO3, les taux de gestation n'ont pas été affectés, en comparaison aux

embryons cultivés en présence de sérum ou aux embryons frais, respectivement: 55% et 60% vs. 57% et 45% vs. 57% et 59% (Gómez et al., 2020). De ce fait le CRYO3 semble un bon candidat pour la cryopréservation des embryons.

L'ajout de dextrane, un polymère, de haut poids moléculaire, au milieu de vitrification d'embryon permet d'augmenter la viscosité du milieu de vitrification et de limiter l'apparition de cassures dans la substance vitrée. L'ajout de PVA permettrait également d'inhiber la formation des cristaux de glace. Ajoutés ensemble, ces cryoprotecteurs permettraient de diminuer les concentrations de cryoprotecteurs pénétrants. En effet, l'ajout de 10% de dextrane et 1% de PVA au milieu de vitrification permet d'abaisser la concentration du DMSO à 15% et d'obtenir des résultats de ré-expansion supérieurs à ceux obtenus avec un milieu de vitrification composé de 20% d'EG et de DMSO, respectivement (76,9 vs. 50,9%, $p < 0,05$) (Viudes De Castro et al., 2010).

Il semblerait donc qu'abaisser la concentration en cryoprotecteurs pénétrants en multipliant les cryoprotecteurs extracellulaires permettrait de diminuer leur toxicité.

Les poloxamères sont des copolymères synthétiques non ioniques à trois blocs, possédant un bloc central hydrophobe et deux blocs périphériques hydrophiles. Le poloxamère 188 ou pluronic F68, possède des propriétés surfactantes et permettrait de faciliter la réparation des dommages membranaires en s'intégrant aux membranes phospholipidiques et en augmentant la densité de lipides au niveau des endroits lésés (Moloughney and Weisleder, 2012). Le P188 interagirait donc de manière préférentielle avec les membranes dont les lipides sont en phase désordonnée (Maskarinec et al., 2005). De plus, une fois les membranes réparées le P188 serait éliminé, ne laissant aucun résidu synthétique dans la membrane. Ajouté au milieu de culture de cellules rénales à hauteur de 0,2 à 0,8% il a permis l'augmentation des taux de viabilité cellulaire de 70%. Lorsque des cellules de myélome sont congelées avec un milieu synthétique additionné d'1% de P188, il a permis l'augmentation de 40% les taux de survie post décongélation (González Hernández and Fischer, 2007). Lorsque des morulas de souris sont congelées avec un milieu contenant 5% de glycérol et 0,05% de P188, il a permis l'obtention de taux de cryosurvie identiques au milieu contenant 5% de glycérol et 0,3% de BSA. Le P188 permettrait donc de se passer de composés d'origine animale pour la congélation des embryons de souris (Palasz et al., 2000). Peu de données existent sur l'utilisation de P188 dans les milieux de congélation des embryons bovins. Cependant d'après ses propriétés biochimiques, il semble être un bon candidat pour la cryopréservation des embryons.

De nombreuses molécules permettant l'utilisation de milieux de cryopréservation entièrement synthétiques sont à notre disposition. Aujourd'hui, l'enjeu est de trouver une combinaison de ces facteurs synthétiques permettant la cryosurvie d'un maximum d'embryon. La mise au point d'un tel protocole est complexe puisque chaque cryoprotecteur a des propriétés propres et ces propriétés peuvent varier si plusieurs cryoprotecteurs sont combinées et interagissent ensemble.

2. Objectifs de la thèse

Actuellement, les biotechnologies de la reproduction et de l'embryon sont largement utilisées par les entreprises de sélection bovines afin d'accroître le progrès génétique par la réduction de l'intervalle entre générations et l'augmentation de l'intensité de sélection. En théorie, l'approche la plus efficace consiste à produire des embryons *in vitro* à partir des gamètes des meilleurs reproducteurs, à les biopsier (pour génotypage) et à les congeler pour ne transférer que les plus intéressants dans des femelles receveuses de niveau génétique moindre. Toutefois, les taux de gestation plus faibles obtenus dans ce cas, de l'ordre de 30 % (De Sousa et al., 2017), induisent un coût trop important, limitant de fait l'essor de cette approche et le progrès génétique réalisable annuellement. Ces mauvais résultats sont imputables à la moindre qualité des embryons produits *in vitro* par rapport à ceux produits *in vivo*, notamment à cause de modifications métaboliques impactant leur composition lipidique et leur cryotolérance.

Face à ce constat, le projet de thèse a pour objectifs (1) d'évaluer et de moduler le profil lipidique des embryons produits *in vitro* (PIV) pour se rapprocher de celui des embryons produits *in vivo* (considérés comme la référence) et (2), de développer de nouveaux protocoles de cryoconservation permettant de minimiser les dégâts cellulaires en jouant sur la composition des solutions cryoprotectrices utilisées. Outre l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques (profil lipidique d'embryons d'origines variées, toxicité des protocoles de cryoconservation), le projet de thèse devrait permettre d'aboutir à un protocole de production *in vitro* optimisé améliorant la congélabilité des embryons produits *in vitro* ainsi qu'à une méthode de cryoconservation minimisant les altérations cellulaires. *In fine*, les acquis du projet permettront d'améliorer l'efficacité des biotechnologies de l'embryon avec un objectif de taux de gestation de 50% après transfert d'embryons produit *in vitro* biopsiés et cryoconservés. Ces résultats permettraient de généraliser le recours à la production *in vitro* qui, couplée au génotypage embryonnaire, conduira à une augmentation du progrès génétique et une diminution des coûts de schéma de sélection

1. Evaluer et moduler le profil lipidique des embryons produits *in vitro*

1.1. Evaluer le profil lipidique des embryons produits *in vitro*

Comme évoqué précédemment, les embryons PIV sont de qualité inférieure à leurs homologues produits *in vivo* et leur différence de métabolisme se traduit notamment par un contenu lipidique déviant induisant une plus faible tolérance à la cryoconservation. Cependant, la composition lipidique précise de chaque catégorie d'embryons n'est pas encore totalement connue à ce jour, l'essentiel des travaux s'étant attachés à des analyses transcriptomiques des gènes liés au métabolisme lipidique ou encore à l'étude des gouttelettes lipidiques par imagerie. De récentes études ont analysé la composition lipidique de cellules reproductrices en spectrométrie de masse utilisant des cellules entières (Intact Cell MADi TOF) permettant ainsi d'apporter des connaissances nouvelles (Banliat et al., 2020; Bertevello et al., 2018; Freret et al., 2019a). Cependant, l'approche utilisée par ces équipes, sans extraction préalable, peut présenter des biais et des limitations dans l'identification des différentes classes de lipides avec une variabilité potentiellement élevée. Ainsi, la première tâche du programme de thèse a pour objectif de produire et de biopsier des embryons *in vitro* par OPU-FIV et d'analyser la composition lipidique (identification et quantification relative des différentes classes de lipides) par UPHLC-HRMS (Ultra-performance liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry) après extraction lipidique par solvants. Cette nouvelle approche permettra une identification plus fiable et reproductible des différentes familles lipidiques entrant en jeu. La signature lipidique de ces embryons sera alors comparée à celle d'embryons produits *in vivo* (considérés comme le gold standard) à partir des mêmes génisses donneuses selon un dispositif en carré latin permettant de gommer les variabilités individuelles. L'ensemble des embryons produits sera biopsié ce qui permettra de déterminer le sexe des embryons analysés pour le prendre en compte dans l'étude des profils lipidiques. Les embryons seront pour moitié congelés avec un protocole utilisé en routine par les entreprises de sélection (protocole EG-Sucrose) pour la congélation de l'embryon bovin, ceci permettra de comparer le profil lipidique des embryons avant et après congélation.

1.2. *Evaluer l'impact de la supplémentation des donneuses en oméga-3 sur le profil lipidique de l'embryon*

Cette tâche sera l'occasion de valoriser des embryons produit *in vitro* par OPU-FIV à partir de vaches en lactation dont la ration alimentaire avait été supplémentée en acide gras de type oméga-3 et oméga-6 (Freret et al., 2019a). Les auteurs ont précédemment mis en évidence une amélioration de la qualité ovocytaire des femelles supplémentées en oméga-3, avec une augmentation du nombre de COCs ponctionnés (38.0 vs 32.8% $p = 0.004$), une augmentation des taux de blastocystes de bonne qualité (42,2 vs. 32,7%, $p = 0.02$) ainsi qu'une modulation de la composition lipidique ovocytaire. Cependant cette étude n'a pas permis d'étudier la composition lipidique des embryons produits ni leur cryotolérance. L'étude du profil lipidique de ces embryons stockés permettra d'évaluer si les modifications acquises au niveau ovocytaire se maintiennent après le processus de fécondation et développement *in vitro* et si la modulation du régime alimentaire de la femelle donneuse constitue un levier d'amélioration prometteur pour les entreprises de sélection. Cependant, il est nécessaire de souligner que le protocole de congélation des embryons utilisé dans cette étude (protocole Glycérol-Tréhalose) diffère de celui utilisé aujourd'hui par les entreprises de sélection et adopté en tâche 1.1 (protocole EG-Sucrose). De ce fait, des embryons produits *in vitro* par OPU-FIV à partir des mêmes génisses donneuses seront congelés avec le protocole Glycérol-Tréhalose pour être en mesure d'évaluer l'impact (1) du système de production (génisse et vache ; 5 ans d'intervalle) et (2) du protocole de congélation lente (Glycérol-Tréhalose vs. EG-Sucrose).

1.3. *Moduler le profil lipidique des embryons produits in vitro*

Par la suite, différentes expériences de production *in vitro* seront menées à partir d'ovaires collectés en abattoir, visant à moduler *in vitro* la qualité embryonnaire en jouant sur l'ajout de différents médiateurs du métabolisme lipidique, comme l'ajout de lipides de type oméga-3, connu comme impactant à la fois la fluidité des membranes et les réserves lipidiques. L'objectif étant d'améliorer la qualité des embryons et de limiter leur cryosensibilité. Les embryons après culture *in vitro* de 7 ou 8 jours seront congelés selon le protocole de congélation lente utilisé pour la Tâche 1.1, soit un protocole à base d'éthylène glycol et de sucrose (EG-Sucrose) couramment utilisé pour la cryopréservation de l'embryon bovin.

Après réchauffement, la viabilité des embryons sera évaluée à l'aide de différents critères *in vitro*, comme la mesure des taux de cryosurvie à 24 et 48 h post décongélation, le comptage du nombre de cellules totales et l'évaluation de l'expression du gène de pluripotence SRY-box transcription factor 2 (SOX2) par imagerie confocale.

2. Optimiser les protocoles de cryopréservation des embryons

PIV

Cette tâche correspond à l'optimisation du protocole de cryoconservation actuellement utilisé sur le terrain qui comprend une congélation lente des embryons dans une solution d'éthylène-glycol et de sucrose permettant le transfert direct des embryons après réchauffement (Bruyere, Baudot et al. 2012). Les innovations testées porteront sur la composition des solutions cryoprotectrices et les cinétiques de refroidissement et de réchauffement (congélation lente, vitrification); ces dernières étant directement liées au type de dispositifs utilisés pour le conditionnement des embryons.

Les milieux de congélation habituels contiennent des dérivés de produits animaux, dont la composition variable et non définie peut conduire à des résultats différents en fonction des lots et dont l'origine biologique n'assure pas une garantie sanitaire absolue. L'enjeu actuel consiste à remplacer ces dérivés par des composés synthétiques de composition chimiquement définie. Pour ce projet, nous avons choisi d'utiliser le CRYO3 (Stem alpha, St Laurent de Chamousset, France), un milieu breveté synthétique sans produit d'origine animale. Deux concentrations ont été évaluées (20 et 100%), dans un protocole de congélation lente et de vitrification. Un premier criblage a été mené sur embryons entiers compte tenu de la lourdeur du protocole de biopsie et en partant du principe qu'un protocole délétère pour des embryons entiers le sera davantage pour des embryons biopsiés, du fait de leur plus grande fragilité. Les protocoles permettant l'obtention des meilleurs résultats seront ensuite utilisés sur embryons biopsiés. Enfin, afin de déterminer l'impact de l'absence de blastocœle résultant de la biopsie, les embryons seront remis en culture après biopsie jusqu'à reformation du blastocœle et seront congelés et vitrifiés avec les mêmes solutions que celles retenues précédemment.

Après réchauffement, la viabilité des embryons sera évaluée à l'aide de différents critères *in vitro*, comme la mesure des taux de cryosurvie à 24 et 48 h post décongélation/dévitrication, le comptage du nombre de cellules totales et l'évaluation de l'expression du gène de pluripotence SOX2 par imagerie confocale.

3. *Article 1. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process*

Sarah Janati Idrissi^{1*}, Daniel Le Bourhis¹, Antoine Lefevre², Patrick Emond^{2,3}, Laurene Le Berre¹, Olivier Desnoës¹, Thierry Joly^{4,5}, Samuel Buff⁵, Virginie Maillard⁶, Laurent Schibler¹, Pascal Salvetti¹ & Sebastien Elis⁶

¹Allice, 37380 Nouzilly, France.

²UMR 1253, iBrain, Université de Tours, 37004 Inserm Tours, France.

³CHRU Tours, 37004 Tours, France.

⁴Université de Lyon, ISARA-Lyon, UPSP ICE 2016.A104, 69007 Lyon, France.

⁵Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP ICE 2016.A104, 69280 Marcy l'Etoile, France.

⁶CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, 37380 Nouzilly, France. 

* Correspondence: sarah.janati-idrissi@allice.fr

Published: 02/06/2021

Journal: *Scientific report* (2021) 11:11618

The article and all supplementary data are available online in open access by following this link:

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90870-8>

Abstract

Currently, *in vitro* embryo production (IVP) is successfully commercially applied in cattle. However, the high sensitivity of embryos to cryopreservation in comparison to *in vivo* (IVD) embryos slows the dissemination of this biotechnology. Reduced cryotolerance is frequently associated with lipid accumulation in the cytoplasm mainly due to *in vitro* culture conditions. The objective of this study was to evaluate the lipid composition of biopsied and sexed embryos, produced either *in vivo* or *in vitro* from the same Holstein heifers before and after a slow freezing protocol. Lipid extracts were analysed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, which enabled the detection of 496 features. Our results highlighted a lipid enrichment of IVP embryos in triglycerides and oxidised glycerophospholipids and a reduced abundance in glycerophospholipids. The slow freezing process affected the lipid profiles of IVP and IVD embryos similarly. Lysophosphatidylcholine content was reduced when embryos were frozen/thawed. In conclusion, the embryonic lipid profile is impacted by IVP and slow freezing protocols but not by sex. Lysophosphatidylcholine seemed highly sensitive to cryopreservation and might contribute to explain the lower quality of frozen embryos. Further studies are required to improve embryo freezability by modulating the lipidome.

Subject terms: Developmental biology, Embryology, Animal biotechnology

Introduction

Embryo biotechnologies are widely used by cattle breeding companies to increase genetic progress by reducing the generation interval and increasing selection intensity. In theory, the most efficient approach would consist in producing numerous *in vitro* embryos from the best reproducers, biopsy and freeze them to perform their genetic evaluation and transfer into recipients only the most interesting genotypes¹. However, the low pregnancy rates reported following the transfer of biopsied and frozen *in vitro* produced embryos, averaging 20% after 60 days of gestation (50% when they were freshly transferred), led to excessive extra-costs and losses of elite embryos, limiting the widespread use of this approach and the achievable annual genetic progress^{2,3}.

These low pregnancy rates are partly attributable to the lower quality of *in vitro* produced embryos compared to those produced *in vivo*⁴⁻⁶. They exhibit a more fragile zona pellucida, more chromosomal abnormalities and a modulated metabolism^{7,8}. Differences between the two embryonic origins are partly based on metabolic changes affecting their lipid composition and their cryotolerance. Indeed, *in vivo* embryos exhibited low metabolic activity leading to an absence of lactate production whereas *in vitro* matured oocytes produced a measurable amount of lactate⁹, likely due to a stress response to suboptimal culture conditions⁷. The addition of foetal calf serum (FCS) to oocyte and embryo culture media stimulates embryonic development and leads to higher blastocyst and hatching rates than a serum-free medium. However, FCS remains an unsanitary/unsafe product of variable composition between production batches. It includes undefined compounds that could be responsible for variability in the oocyte and embryonic media composition, potentially leading to unreproducible results¹⁰. Moreover, the addition of FCS for embryo development has been associated with an abnormal accumulation of lipid droplets^{11,12} which are strongly correlated with apoptosis in fresh blastocysts¹² and embryo cryo-susceptibility¹¹⁻¹³. The cause of this accumulation of lipids in *in vitro* embryos produced is still unclear.

The high sensitivity to the cryopreservation process also results in low conception rates compared to those obtained from *in vivo* produced embryos¹². During cryopreservation, the lipid phase transition, followed by separation, is one of the major causes of cryo-damages in lipid-rich oocytes and embryos^{14,15}. Cryopreservation can damage membrane integrity by causing membrane chilling injuries^{15,16}. Altogether these effects reduced blastocyst re-expansion and total cell number and enhanced apoptosis rates which led to a decrease in survival rate after freezing¹⁷⁻¹⁹. Attempts to optimise embryo cryopreservation were mainly based either on the improvement of the cryopreservation techniques to make them less damaging or by modulating embryo composition, especially in lipids, to make them more resistant to the freezing process. Lipids, particularly phospholipids, are major components of mammalian cell membranes and affect the strengthening of membranes for cryopreservation. Cryo

resistance of the cells may therefore be improved by making their membrane more fluid²⁰. Membrane fluidity can be influenced by fatty acid composition, especially by the level of unsaturation in glycerophospholipids and by the amount of cholesterol present in the membrane.

We, therefore, hypothesised that the difference in quality and/or cryotolerance between *in vitro* and *in vivo* produced embryos could be related to a difference in their lipid composition. Thus, the objective of this study was to evaluate, using mass spectrometry, the lipid content of single biopsied bovine grade 1 blastocysts from *in vivo* and *in vitro* origin and determine whether the slow freezing process has an impact on their lipid profiles. Moreover, sexing all embryos using biopsies allowed us to evaluate whether lipid profiles can vary according to sex.

Methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise stated.

Experimental design

All experimental protocols were conducted following the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the French Ministry of National Education, Higher Education, Research, and Innovation after ethical assessment by the local ethics committee “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire” (protocol registered under APAFIS number 20013-2019032818243107v2). The present study is also in accordance with the ARRIVE guidelines.

To produce *in vitro* and *in vivo* embryos, eight Holstein heifers were subjected both to oocytes collection by ovum pick-up followed by *in vitro* fertilisation procedures (OPU-IVF) and to embryo collection by non-invasive flushing of uterine horns. Heifers were between 24 and 30 months old and weighed between 480 and 590 kg at the time of collection. To avoid any seasonal or individual effects, the experimental design was performed in Latin square using two groups of four individuals. Between the last OPU and the first embryo collection a 7-week rest period was allowed (and vice versa).

All heifers underwent an average of 3 sessions of embryo collection and five OPU sessions to obtain a minimum of forty expanded grade-1 blastocysts of both origin (44 *in vivo* vs. 43 *in vitro*). A single ejaculate from one bull (FR1532181070, Evolution cooperative, France) of proven fertility was used for all the experiments (*in vivo* and *in vitro* embryo production). All these embryos were biopsied and half of them were frozen (n = 20) for further lipid extraction while the remaining half was used for immediate lipid extraction in a fresh state (n = 20). Thus, four experimental groups of biopsied embryos were

constituted: *in vivo* frozen embryos, *in vivo* fresh embryos, *in vitro* frozen embryos, and *in vitro* fresh embryos (Figure 1.).

Oestrus synchronization

To produce embryos, experimental heifers were subjected to oestrus synchronisation and ovarian stimulation protocols before either artificial insemination (*in vivo* embryos) or OPU sessions (*in vitro* embryos). Synchronisation treatments were performed by insertion of an intravaginal progesterone releasing device (Prid Delta, 1.55g, Ceva, Libourne, France) and followed, six days later, by 2 mL intramuscular injection of a prostaglandin F2 α analogue (Estrumate, MSD Santé Animale - Intervet, France; equivalent to 0.5 mg cloprostenol). The removal of the intravaginal device was performed 24 h after cloprostenol injection. Reference heat was detected by the monitoring of activity and rumination (Heatime, Evolution XY, France) of heifers an average of 48h after intravaginal device removal. Dominant follicles (follicles with a diameter > 8 mm) were ablated between 8 and 12 days later.

***In vivo* embryo production**

Ovarian stimulation treatment started 48 h after the removal of the dominant follicles. A new intravaginal progesterone device (Prid Delta, 1.55 g, Ceva, Libourne, France) was inserted and the ovarian stimulation was performed by 8 intramuscular injections of decreasing pFSH/pLH doses (Stimulfol, Reprobiol, Ouffet, Belgium), every 12h, over four days.

- Day 1: 7 a.m. and 7 p.m.–60 μ g FSH/12 μ g LH
- Day 2: 7 a.m. and 7 p.m.–50 μ g FSH/10 μ g LH
- Day 3: 7 a.m. and 7 p.m.–40 μ g FSH/8 μ g LH
- Day 4: 7 a.m. and 7 p.m.–25 μ g FSH/5 μ g LH

Luteolysis was induced with 2 mL intramuscular injection of a prostaglandin F2 α analogue (Estrumate, MSD Santé Animale – Intervet, France; equivalent to 0.5 mg cloprostenol), together with the fifth pFSH injection. The PRID DELTA device was removed just after the sixth pFSH injection. All females were artificially inseminated twice with the same frozen-thawed semen 12 and 24h after oestrus detection by the monitoring of activity and rumination (Heatime, Evolution XY, France). The semen used for all insemination came from the same ejaculate of one bull of proven fertility (GIAGI, FR1532181070, Evolution cooperative, France). Seven days after the first AI embryo collections were performed. For all embryo collections, an epidural injection of 3 to 5 mL (1 mL/100 kg) of Procamidol

(procaine; Richter Pharma, Austria) was performed and the anogenital area was carefully cleaned with an iodine povidone diluted solution (Vétédine solution, Vétéquinol, France). Before collection, heifers were examined by rectal palpation or by an ultrasound exam to evaluate the number of corpus lutea. A flushing solution (Euroflush; IMV Technologies, France) was warmed and maintained in a water bath at 35 °C during the duration of the collection. A cervical dilator was introduced for a few minutes into the cervix. Then, the three-way collection catheter was introduced through the cervix into the first horn 10cm beyond the uterine bifurcation; the cuff was then inflated with 10 to 12 mL of air. The uterine horn was flushed using 500 mL flushing solution and collected back in a single-use embryo filter (Miniflush Minitübe, Germany). Thereafter, the three-way collection catheter was withdrawn back, and the same procedure was used for the second horn. After each procedure, a 2 mL intramuscular injection of a prostaglandin F2 α analogue (Estrumate, MSD Santé Animale – Intervet, France; equivalent to 0.5 mg cloprostenol) was given to flushed females to avoid any pregnancies and return to oestrus.

After microscopic evaluation, embryos were classified for quality and stage of development according to the International Embryo Technology Society recommendations (Chapter 9 and Annex D, IETS Manual, 3rd edition). Only grade-1 expanded blastocysts were used for the experiment i.e., expanded blastocysts with compact cell mass, uniformly colored blastomeres, few irregularities or excluded cells and an intact and smooth zona pellucida. Embryo collection was performed every 42 days for up 3 collections.

***In vitro* embryo production**

Ovarian stimulation was performed 36 h after the removal of the dominant follicles. A new intravaginal progesterone device (Prid Delta, 1.55g, Ceva, Libourne, France) was inserted, and the ovarian stimulation was performed by 5 intramuscular injections of decreasing pFSH/pLH doses (Stimulfol, Reprobiol, Ouffet, Belgium), every 12h, over 2.5-days.

- Day 0.5: 7 p.m.–75 μ g FSH/15 μ g LH
- Day 1: 7 a.m.–62.5 μ g FSH/12.5 μ g LH
- Day 1: 7 p.m.–50 μ g FSH/10 μ g LH
- Day 2: 7 a.m.–37.5 μ g FSH/7.5 μ g LH
- Day 2: 7 p.m.–25 μ g FSH/5 μ g LH

Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected by OPU. After performing locoregional anaesthesia by injection of 3 to 5 mL (1 mL/100 kg) (Procamidol, Richter Pharma, Wels, Austria), the anogenital area was cleaned and disinfected with an iodine povidone diluted solution (Vétédine

solution, Vétédine Savon, Vétéquinol, Lure, France). A guide containing an ultrasonographic probe was inserted into the vagina and the ovary was placed by the technician transrectally against the probe (probe EC123, 7.5 MHz, echograph MyLab30, ESAOTE Pie Medical, Saint-Germain-en-Laye, France). Before the puncture, a needle holder, including a needle (18G) and linked to a suction system, was rinsed in flushing solution added with heparin (Heparin Choay, 25 000 UI/5 mL, Sanofi-Aventis, France) (1:50) to prevent the formation of blood clot in the tubing. Then, the needle holder was introduced transvaginally⁵⁵. Follicles from both ovaries, from 6 to 12 mm in diameter, were aspirated and recovered in a 50 mL Falcon tube, containing 1 mL of flushing solution added with heparin (1:50), maintained at 37°C. OPU-IVF was performed every two weeks for up to an average of 5 sessions per heifer.

In vitro maturation

The recovered COCs were selected under a stereomicroscope. Only COCs with homogenous, non-granular cytoplasm and having at least 3 layers of granulosa cells were used⁵⁶. The COCs were washed at 37°C, three times in embryo flushing media (Euroflush, IMV Technologies, France). The fourth time, COCs were washed in *in vitro* maturation medium, which consisted in TCM-199, supplemented with 10% FCS (v/v), 10 µg/mL pFSH/pLH, 1 µg/mL 17β-œstradiol, 5 ng/mL epidermal growth factor and 5 µg/mL gentamicin. All COCs were incubated at 38.5°C for 22 h under a maximum humidity atmosphere of 5% CO₂ in the air.

In vitro fertilisation

Motile spermatozoa were obtained by centrifuging thawed semen on a Percoll gradient composed with two solutions (40% vs. 80%) (Bovidilute and Bovipure, Nidacon, Suede) for 20 minutes at 500 g. In parallel, matured oocytes were washed two times and then fertilised in 500 µL of a modified Tyrode's bicarbonate buffered solution (Fert TALP) containing 10 µg/mL heparin, 6 g/L BSA, 20 µM penicillamine, 10 µM hypotaurine, 1 µM epinephrine and 20 µM sodium pyruvate⁵⁷. A single ejaculate from one bull (GIAGI, FR1532181070, Evolution cooperative, France) of proven fertility was used for both *in vitro* and *in vivo* embryo production. Percoll treated spermatozoa were coincubated with COCs at 10⁶ spermatozoa/mL at 38.5°C for 18 h in a maximal humidified atmosphere of 5% CO₂ in the air.

In vitro embryo development

Eighteen hours after fertilisation all presumptive zygotes were cleared of cumulus cells and spermatozoa attached to the zona pellucida by delivery pipetting. Zygotes were washed twice in synthetic oviductal fluid (SOF, Minitüb, GmbH, Germany) supplemented with 1% of oestrus cow serum, 2% MEM 100x, 1% BME 50x, 0.33 g/L Na-Pyruvate and 6 g/L fatty-acid-free BSA at 38.5°C in a maximal humidified atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂, and then were cultured in a micro drop (30 µL) covered with mineral oil (Liquid Paraffin, Origio, Måløv, Denmark). Each micro drop contained between 1 and 14 embryos (7.0 ± 0.6) depending on the number of oocytes recovered by OPU.

Cleavage rates were assessed under stereoscopic microscopy at 20X magnification 48 h post-fertilisation (day 2) and blastocyst development rates and embryo quality were recorded at day 6 and day 7.

Embryo biopsies

Biopsies were performed manually using a three-axis hanging joystick oil hydraulic micromanipulator (Narishige, Tokyo, Japan), coupled with an inverted microscope (Nikon eclipse TS100, Tokyo, Japan) and stainless homemade microblade. The homemade microblade was made from a razor blade piece (Moria, Antony, France) stick with glue to a stainless support which is finally fixed to a micromanipulator. For biopsy, expanded grade-1 blastocysts were fixed from ICM side by a holding pipette and then the microblade was placed on the edge of the embryo end, at the opposite from ICM, and moved down to separate an average of 10 trophectoderm cells.

Embryos were micro manipulated on a dish containing 200 µL of embryo holding medium (EHM, IMV Technologies, France). The biopsied cells (5-10 blastomeres) used for embryo sexing were removed from the trophectoderm and were transferred to a 0.5 mL vial and immediately cryopreserved on dry ice before being stored at -80°C until analysis. To prevent genomic DNA contamination between embryos, the microblade and holding pipette were washed using ethanol–acetic acid and rinsed in a water bath between each biopsy.

After biopsy half of the biopsied embryos from both groups, *in vivo* (n = 22) and *in vitro* (n = 22), was randomly transferred in a 1.5 mL vial in a minimum volume of EHM for the lipid extraction experiment, and the other half from both groups, *in vivo* (n = 22) and *in vitro* (n = 21) was frozen.

Embryo Freezing

For the slow freezing procedure, embryos were washed in EHM and placed in 1.5 M ethylene glycol embryo freezing medium (ET freezing media, IMV, Technologies, France) with 0.1 M sucrose added for 10 min at room temperature. Embryos were individually mounted in 250 μ L straws, respecting the following proportion 4:2:4. The first column was composed of EHM, the second column contained embryos in freezing media, the third column was composed of EHM. The column containing embryos was separated from others by air. Straws were placed in the cryochamber of the freezer (Freeze Control, Cryologic, Australia), previously equilibrated at -6°C. After 2 minutes, the seeding was manually induced. The temperature was stabilised at -6°C for 8 minutes post-seeding and then dropped to -32°C at a rate of -0.3°C/min. At the end of the program, straws were directly plunged in liquid nitrogen and stored for one week before thawing and lipid extractions. For thawing, straws were kept 5 s in ambient air and then immersed in a water bath at 35°C for 30 s. Embryos were washed three times in PBS and transferred in 1.5 mL vials in minimum volumes for lipid extractions.

Embryo Sexing

Sex determination was performed by Y chromosome-specific DNA probe technology coupled with amplification by PCR⁵⁸. Biopsies were lysed in 0.015 mol/L KCl medium supplemented with 2 g/L BSA (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). In each tube, 20 μ L of buffer containing proteinase K and the two primers were added. All samples were denatured at 95°C for 15 min to stop the proteinase K action. The reaction medium (20 μ L) including the nucleotides and the TAQ polymerase was then added. The mixture was amplified for 29 cycles consisting of denaturation at 95°C for 30 s, hybridisation at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. After the last cycle, all samples were incubated for a further 5 min to assure complete extension at 72°C. A total of four controls were processed simultaneously: two male controls (20 and 200 pg male DNA), one female control (100pg female DNA) and a negative control (no DNA)⁵⁹. PCR products were analysed using an E-gel iBase (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

After migration by electrophoresis, the resulting bands were observed with UV transillumination. The Y-specific primer generated a 148-base pair (bp) fragment in male samples and the internal control primer generated a 443bp fragment in all samples. No band was revealed in the negative control. After visualisation, the samples generating two bands corresponded to male embryos and samples generating only one band were female embryos.

Lipid analysis by mass spectrometry, sample preparation and data acquisition

The liposoluble fraction of each embryo, after trophectoderm biopsy, was individually extracted based on a modified Bligh and Dyer method⁶⁰. Briefly, 425 μL of diluted methanol in sterile water (75:25) was added to the embryos. Then, the addition of 400 μL of chloroform and 275 μL of sterile water was performed. The mix was then thoroughly vortexed before centrifugation at 10 000 $\times g$ for 10 minutes at 4°C. The lower phase (350 μL) corresponding to the nonpolar fraction was recovered and put in glass tubes for further solvent evaporation in a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for 45 min at room temperature. The residue was then reconstituted with 100 μL of a 6:3:1 mix of acetonitrile (ACN)/water/isopropanol followed by centrifugation (15,000 $\times g$, 10 min, 4°C) before mass spectrometry analysis.

LC-HRMS analysis was performed as described by Beauclercq and al.⁶¹. Briefly the analysis was performed on a UHPLC Ultimate 3000 system (Dionex, Sunnyvale, CA), coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and operated in positive ionisation mode (ESI+). Chromatography was carried out with a 1.7 μm C18 (150 mm \times 2.10 mm, 100 Å) UHPLC column (Kinetex, Phenomenex, Torrance, CA) heated at 55°C. The solvent system comprised mobile phase A [isopropanol/ACN (9:1) + 0.1% (vol/vol) formic acid + 10 mM ammonium formate], and mobile phase B [ACN/water (6:4) + 0.1% (vol/vol) formic acid + 10 mM ammonium formate]; the gradient operated at a flow rate of 0.26 mL/min over a run time of 24 min. The multistep gradient was programmed as follows: 0 to 1.5 min-32% to 45% A, 1.5 to 5 min-45% to 52% A, 5 to 8 min-52% to 58% A, 8 to 11 min-58% to 66% A, 11 to 14 min-66% to 70% A, 14 to 18 min-70% to 75% A, 18 to 21 min-75% to 97% A and 21 to 24 min-97% A. The autosampler temperature (Ultimate WPS-3000 UHPLC system, Dionex) was set at 4°C, and the injection volume for each sample was 5 μL . The heated ESI source parameters were a spray voltage of 3.5 kV, a capillary temperature of 350°C, a heater temperature of 250°C, a sheath gas flow of 35 arbitrary units (AU), an auxiliary gas flow of 10 AU, a spare gas flow of 1 AU and a tube lens voltage of 60 V for C18. During the full-scan acquisition, which ranged from 250 to 1600 m/z, the instrument operated at 70,000 resolution, with an automatic gain control target of 1×10^6 charges and a maximum injection time of 250 ms. The instrumental stability was evaluated by multiple injections ($n = 9$) of a QC sample obtained from a pool of 10 μL of all samples analysed. This QC sample was injected once at the beginning of the analysis, then after every 10 sample injections and at the end of the run.

LC-HRMS data processing

Galaxy Workflow4metabolomics was used to process the raw data for features detection and retention time correction. Spectra of QC samples was analysed, and each chromatographic peak that

differed from the background noise corresponded to a peak. Features with variance intensities greater than 30% in QC samples or with QC variance superior to sample variance were removed as well as those identified as background noise or poorly integrated after visual inspection⁶². Lipid annotation was performed on SimLipid, a high throughput lipid identification and quantification software. The peak intensities were normalised by the total area of the spectra for each sample, transformed into a logarithm using the automatic transformation tool of SIMCA software (Umetrics, Umeå, Sweden). Lipids were annotated (<0.01 ppm) according to either the homemade SimLipid (highlighted in yellow, in Supplementary Table 1), database or to the LIPID MAPS Lipid Classification System^{63,64} (not highlighted in Supplementary Table 1).

https://www.lipidmaps.org/resources/tools/bulk_structure_searches.php?database=LMSD.

Statistical analysis of data on lipid profile

PCAs were performed on the data as exploratory unsupervised analysis representing the distribution of embryos, of the different comparisons, according to their lipid profile. The proportion of explained variance is represented by the sum of the R^2 of the first two components. A higher R^2 indicated a more accurate model. The ellipse represents the 95% confidence interval (Hotelling's T-square). Multivariate analysis was performed with orthogonal partial least square (O-PLS-DA) approaches, which were performed on the data set in the form of supervised analysis to predict groups by maximising the explained variance between groups, using the SIMCA Software⁶⁵. Ion selection was carried out by repeatedly excluding the variables with low regression coefficients and wide confidence intervals derived from jack-knifing combined with low variable importance in the projection (VIP) until maximum improvement of the quality of the models. Only features with $VIP > 1$ have been presented in Supplementary Table 2. For the comparison of the lipid profiles of the *in vivo* vs. *in vitro* produced embryos, the features with $VIP > 1$ are presented in the green column of the Supplementary Table 2. For fresh vs. frozen *in vivo* produced embryos features with $VIP > 1$ are presented in the blue column, and for *in vitro* embryos, when $VIP > 1$, features are represented in salmon-color column. Model quality was evaluated with cross-validation by Q^2 (goodness of prediction) and CV-Anova (cross-validation-analysis of variance). The CV-Anova is a diagnostic tool for assessing the reliability of O-PLS-DA models; the associated *p*-value is indicative of the statistical significance of the fitted model. The O-PLS-DA models were performed to show the relationship between variance in the data of the embryo origin (*vivo* vs. *vitro*), the state before extraction (*fresh* vs. *frozen*) and the sex of the embryos (*male* vs. *female*). The differentially expressed lipid species between each comparison were identified using nonparametric Wilcoxon tests with FDR correction and a fold-change greater than 1.5 and less than

0.66, on Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). All lipids significantly different are presented in Supplementary Table 1. For each comparison, *in vivo* vs. *in vitro* produced embryo (green column), *in vivo* fresh vs. frozen (blue column) and *in vitro* fresh vs. frozen embryos (salmon-color column), *p*-value, average peak intensity and fold-change are presented. Univariate analysis is represented by a volcano plot combining fold-change and *p*-value of the *t*-tests. The x-axis represents the fold-change between the subject groups (base 2 logarithm scale) and the y-axis represents the *p*-value for the *t*-test of differences between the variables (negative base 10 logarithm scale).

Results

Embryo production data

An average of five embryo production sessions by OPU-IVF (ovum pick up, followed by *in vitro* fertilisation) and three embryo collection sessions by flushing the uterine horn were performed to produce embryos needed for the study. These embryos were produced from eight Holstein Heifers in a Latin square design. The OPU-IVF and embryo collection procedures allowed the generation of 95 and 78 grade one (Q1) expanded blastocysts, respectively (Table 1 A. and 1 B.). The average number of Q1 blastocysts produced *in vitro* was 2.1 ± 0.3 per donor during OPU-IVF session, compared to 3.4 ± 1.0 per donor during *in vivo* embryo session.

Table 1 A. Embryo production data per session of OPU-IVF, **B.** Embryo production data per session of embryo collection.

A OPU-IVF	mean \pm SEM per session	total	B Embryo collection	mean \pm SEM per donor	total
Nb punctured follicles	16.0 \pm 1.2	737	Nb of follicles at first IA	17.1 \pm 1.0	360
Nb recovered COC	8.3 \pm 0.6	381	Nb of follicles at second IA	12.3 \pm 1.5	258
Nb oocytes in IVM	7.1 \pm 0.6	326	Nb of CL	10.5 \pm 0.5	221
Nb cleaved embryos	6.3 \pm 0.5	290	Nb of recovered embryos	5.8 \pm 1.5	133
Nb D6 morulas	1.8 \pm 0.3	82	Nb of degenerate embryos	1.1 \pm 0.4	107
Nb D6 blastocysts	0.2 \pm 0.1	94	Nb of morulas	0.5 \pm 0.3	12
Nb D7 blastocysts	3.7 \pm 0.4	170	Nb of blastocysts	4.1 \pm 1.4	95
Nb D7 blastocysts Q1	2.1 \pm 0.3	95	Nb of blastocysts Q1	3.4 \pm 1.0	78
Nb D7 blastocysts Q2	1.0 \pm 0.1	44	Nb of blastocysts Q2	0.7 \pm 0.5	20
Cleaved embryos (%)	87.3 \pm 3		Viable embryos (%)	80.5 \pm 5.1	
D6 M (%)	21.5 \pm 3		Degenerate embryos (%)	19.5 \pm 5.1	
D6 BL (%)	30.6 \pm 4.2		Morulas (%)	9.0 \pm 8.0	
D7 BL (%)	51.5 \pm 3.8		Blastocysts (%)	71.4 \pm 8.1	
D7 BL Q1 (%)	28.8 \pm 3.7		Blastocysts Q1 (%)	58.6 \pm 8.1	
D7 BL Q2 (%)	22.7 \pm 5.1		Blastocysts Q2 (%)	12.0 \pm 3.1	

Nb: number; Nb of CL: number of corpus luteum at embryo collection procedure; M: morula; BL: blastocyst; D6 and D7: day 6 and 7 of development. Q1 and Q2: embryo quality based on International Embryo Technology Society recommendations.

Lipid composition of bovine embryos

Liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) spectra were obtained for 87 individual Q1 expanded blastocysts using ultra-high pressure liquid chromatography) (UHPLC) and 1686 features were identified. After visual inspection of the data, elimination of ions with coefficient of variation (CV) superior to 30% in the quality control (QC) and isotopes elimination, 496 features were conserved. Among those 496 features, 74 were annotated using the SimLipid Database. Annotated lipids are mostly triglycerides (32/74), diglycerides (12/74), glycerophospholipids and lysophospholipids (12/74) (Supplementary Table 1). Among these 87 individual Q1 blastocysts, 43 were produced by OPU-IVF and 44 by embryo collection. Concerning the 43 *in vitro* embryos, 22 underwent lipid extraction in a fresh state (13 male and 9 female embryos), while 21 were first frozen before undergoing lipid extraction (8 male and 13 female embryos). For embryo collection, 22 underwent lipid extraction in a fresh state (11 male and 11 female embryos), while 22 were first frozen before undergoing lipid extraction (10 male and 12 female embryos) (Figure 1.).

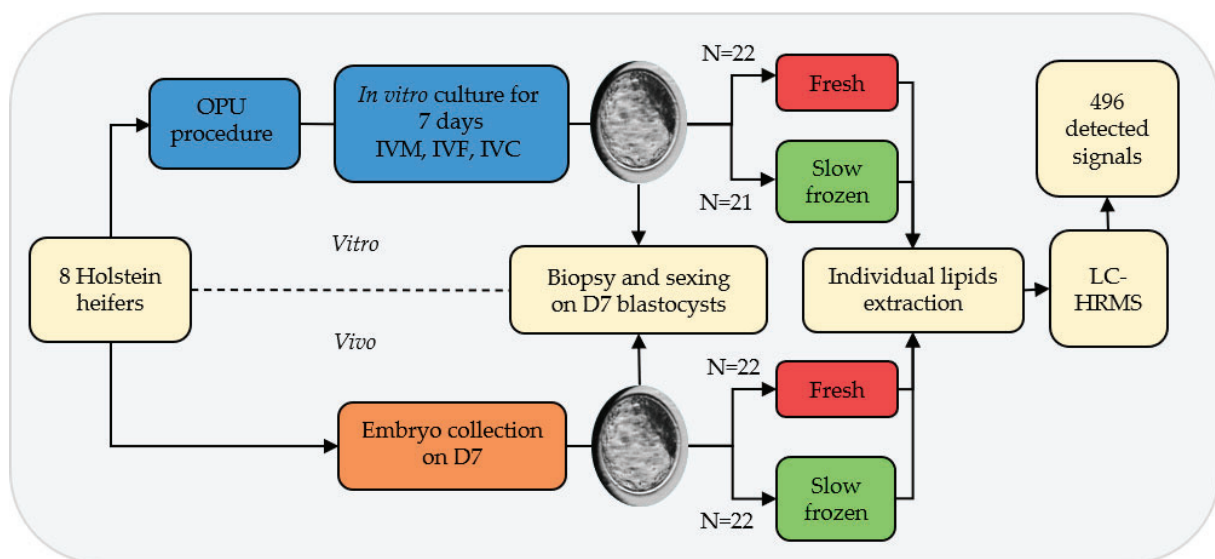


Figure 1. Experimental design. Eight Holstein heifers enabled the production of *in vitro* and *in vivo* embryos by OPU-IVF and embryo collection procedures. After seven days of development, all grade 1 expanded blastocysts were biopsied and sexed. Half of each group underwent lipid extraction in a fresh state, the other half were first frozen before undergoing lipid extraction. Lipid extracts were analysed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and allowed the detection of 496 features.

Mass spectrometry lipid signature in fresh embryos produced *in vivo* or *in vitro*

To evaluate the impact of the embryo origin on their lipid profiles, 44 individual fresh blastocysts were used, including 22 *in vitro* embryos and 22 *in vivo* embryos (Figure 1.). The principal component analysis (PCA) showed a separation between *in vivo* (orange dots) and *in vitro* (blue dots) embryos (Figure 2 A.). The orthogonal partial least square analysis (O-PLS-DA) showed a clear discrimination of the two distinct profiles between *in vivo* (orange dots) and *in vitro* (blue dots) produced embryos, with a cross-validated predictive ability (Q²) of 0.88 and with good reliability of this model evaluated by CV-Anova, *p*-value < 0.0001 (Figure 2 B.). The fitted model included 314 features, meaning that most of the identified features (314/496) participated in explaining the lipid profile difference between *in vivo* and *in vitro* produced embryos (Supplementary Table 2). The univariate analysis highlighted 105 significantly different features between *in vivo* and *in vitro* counterparts (*p* < 0.05 and fold-change < 0.66 or > 1.5), including 50 annotated lipids (Supplementary Table 1). Among the 105 significant features, 27 have a fold-change greater than 2, indicating an increased abundance in *in vitro* produced embryos, and 12 features exhibited a fold-change lower than 0.5, indicating a decreased abundance in *in vitro* produced embryos (Table 2). Among these 105 significant features 10 were not found in the fitted model, including 5 annotated lipids, 2 fatty amide, pipericin and N-oleoyl GABA, 1 oxidized glycerophospholipid, OHOHA-PC, and 2 triacylglycerol's, TG(16:0/16:1/16:1) and TG(46:0). The volcano plot, based on both fold-change and *p*-value, highlighted a general lipid enrichment of *in vitro* produced embryos, particularly in triglycerides (TG) and oxidised glycerophospholipids (OHHdia-PS) which exhibited a fold-change greater than 40 (Figure 2 C.). On the contrary, *in vivo* produced embryos were enriched in glycerophospholipids and particularly in phosphatidyl-ethanolamine (PE), serine (PS), glycerol (PG) and inositol (PI).

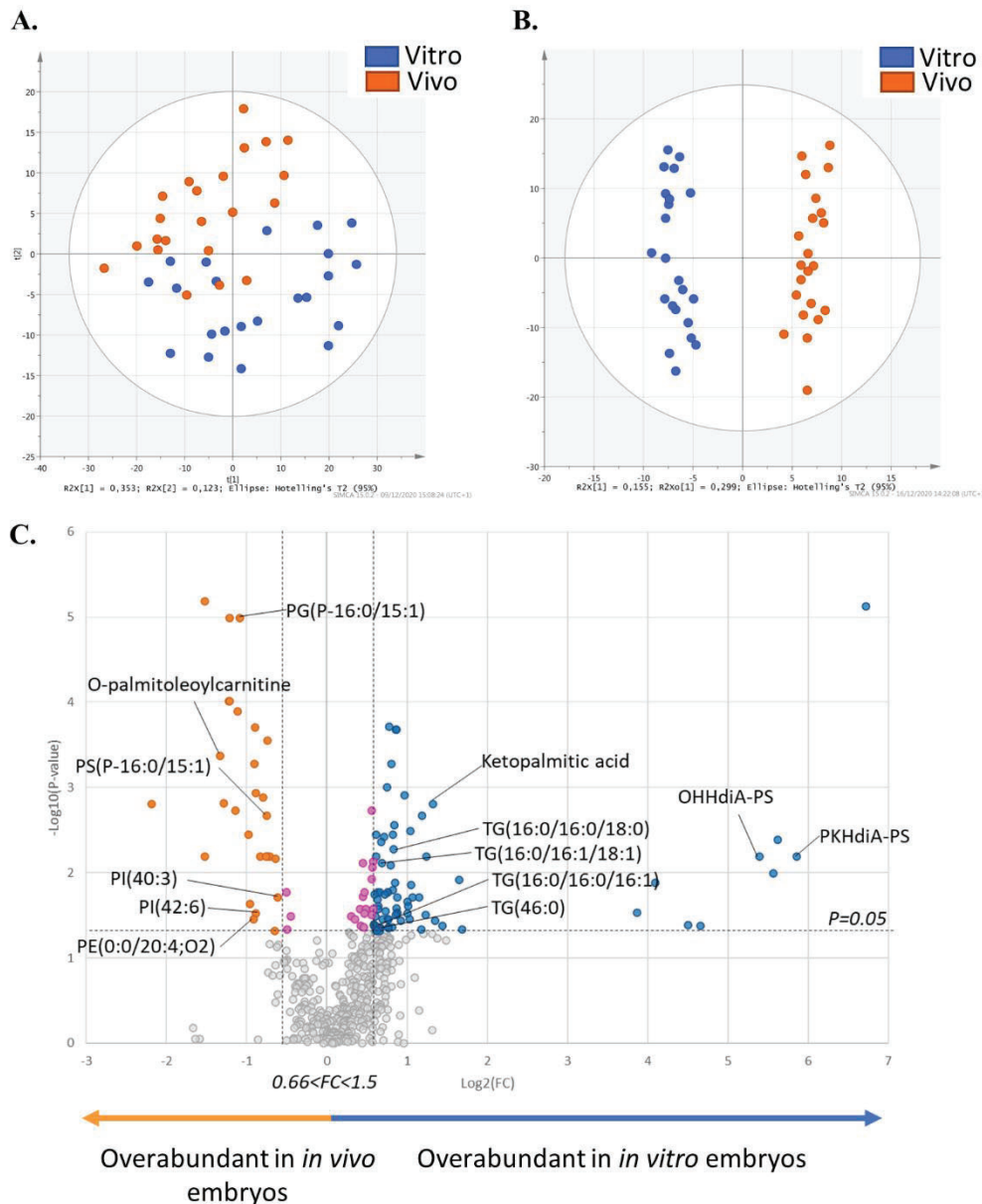


Figure 2. **A.** Principal component analysis plot (PCA) representing variance among *in vivo* and *in vitro* embryos according to principal component analysis. The orange dots show data for embryos with *in vivo* origin, and the blue dots show data for embryos with *in vitro* origin. **B.** Multivariate analysis by orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA), discriminating the embryonic origins (*vivo* vs. *vitro*) according to the lipid profile of the embryos. **C.** Univariate analysis by volcano plot based on fold-change and *p*-value, highlight several lipids. Blue and orange dots correspond to significantly different lipids between *in vitro* and *in vivo* produced embryos. The grey dots represent the non-significant ones. Pink dots correspond to lipids with a significant *p*-value but a fold-change between 0.66 and 1.5. All the lipids to the right of this area are over abundant in the *in vitro* produced embryos (blue dots), while those that are to the left of this area are over abundant in the *in vivo* produced embryos (orange dots). Statistical significance is determined at *p* < 0.05 and fold-change greater than 1.5 or less than 0.66. Significantly different annotated lipids are represented on the volcano plot by the following abbreviations, phosphatidyl-ethanolamine (PE), inositol (PI), serine (PS), glycerol (PG), triglycerides (TG) and oxidised glycerophospholipid (OHHdiA-PS and PKHdiA-PS).

Mass spectrometry lipid signature of *in vivo* produced embryos before and after slow freezing

To analyse the effect of the slow freezing process on *in vivo* produced embryo lipid profiles, 44 individual blastocysts were used, half of them undergoing a slow freezing step, thus generating 22 fresh and 22 frozen *in vivo* produced embryos. The PCA showed a tendency to distinguish *in vivo* fresh (red dots) and frozen (green dots) embryos (Figure 3 A.). A multivariate analysis (O-PLS-DA) showed a clear discrimination of the two distinct profiles between fresh and frozen *in vivo* produced embryos, with a cross-validated predictive ability (Q²) of 0.82 and with good reliability of this model evaluated by CV-Anova, *p*-value < 0.0001 (Figure 3 B.). The fitted model included 162 features that participate in the explanation of the lipid profile difference, between *in vivo* fresh and frozen embryos (Supplementary Table 2). The univariate analysis highlighted 35 features significantly different between fresh and frozen *in vivo* produced embryos (*p* < 0.05, FC < 0.66 or > 1.5) (Table 3), including 20 annotated lipids (Supplementary Table 1). Among the 35 significant features, 19 exhibited a fold-change > 1.5, indicating an increased abundance in frozen *in vivo* produced embryos compared to fresh ones, and 16 features exhibited a fold-change < 0.66, indicating a decreased abundance in frozen *in vivo* produced embryos compared to fresh ones (Table 3). Among the 35 significant features, 2 were not found in the fitted model, including one eicosanoid, ethyl-diacetoxy-6E,8E,10E,14Z-eicosatetraenoate and one monoglyceride, MG(22:5).

The volcano plot highlighted the overabundance of lysophosphatidylcholine (LPC) in fresh *in vivo* produced embryos and the overabundance of two monoglycerides (MG) and one phosphatidylglycerol (PG) in frozen ones (Figure 3 C.). Univariate analysis also showed differences in LPC composition, especially for the LPC (18:2), which was only present in fresh embryos and therefore had a fold-change equal to 0.00 (Table 3).

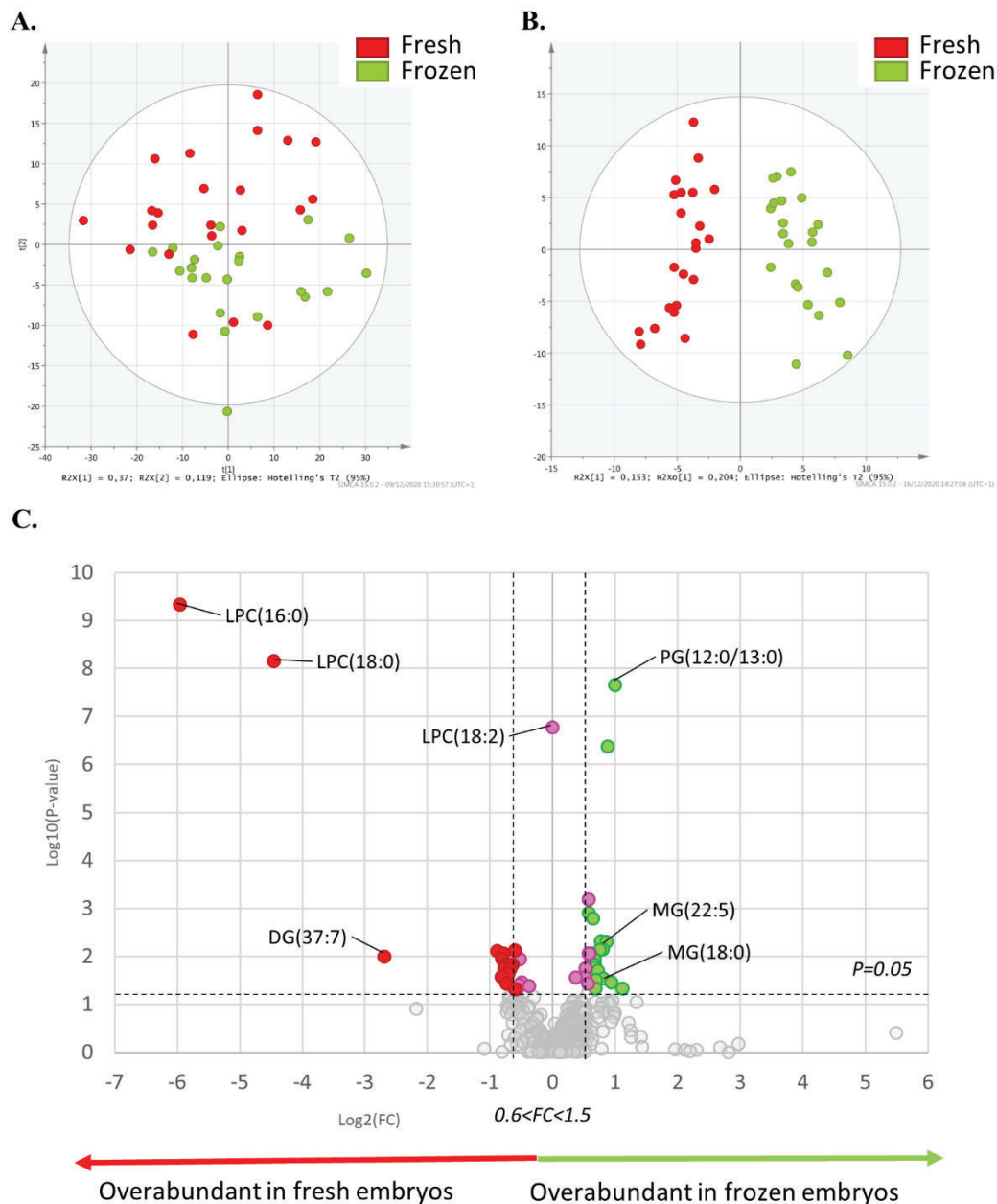


Figure 3. **A.** Principal component analysis (PCA) plot representing variance among *in vivo* fresh and frozen embryos according to principal component analysis. The red dots show data for fresh *in vivo* produced embryos, and the green dots show data for frozen *in vivo* produced embryos. **B.** Multivariate analysis by orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA), discriminating the state before and after freezing (*fresh vs. frozen*) according to the lipid profile of the embryos. **C.** Univariate analysis via volcano plot based on fold-change and *p*-value, highlighted several lipids. Red and green dots correspond to significantly different lipids between fresh and frozen *in vivo* produced embryos. Pink dots correspond to lipids with significant *p*-values but a fold-change between 0.66 and 1.5. All the lipids to the right of this area are over abundant in the frozen *in vivo* produced embryos (green dots), while those on the left of the grey area are overabundant in the fresh *in vivo* produced embryos (red dots). Statistical significance is determined at *p* < 0.05 and fold-change greater than 1.5 or less than 0.66. Significantly different annotated lipids are represented on the volcano plot by the following abbreviations, lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylglycerol (PG), monoacylglycerol (MG) and diacylglycerol (DG).

Mass spectrometry lipid signature of *in vitro* produced embryos, before and after slow freezing

To analyse the impact of the slow freezing process on *in vitro* produced embryo lipid profiles, 40 individual blastocysts were used, half of them undergoing a slow freezing step, thus generating 22 fresh and 21 frozen *in vitro* produced embryos. The PCA showed overlapping groups between *in vitro* fresh and frozen embryos (Figure 4 A.). Multivariate analysis (O-PLS-DA) showed two distinct profiles, with a cross-validated predictive ability (Q²) of 0.82 and with good reliability of this model evaluated by CV-Anova, *p*-value < 0.0001 (Figure 4 B.). The fitted model included 47 features that participate in the explanation of the lipid profile difference between *in vitro* fresh and frozen embryos (Supplementary Table 2). The univariate analysis highlighted four lipids significantly different between fresh and frozen *in vitro* produced embryos (Table 4), including three annotated as LPC (Supplementary Table 1). All the 4 significant features have a fold-change < 0.66, indicating a decreased abundance in frozen *in vitro* produced embryos compared to fresh ones (Table 4). The volcano plot highlighted the overabundance of LPC in fresh *in vitro* produced embryos (Figure 4 C.).

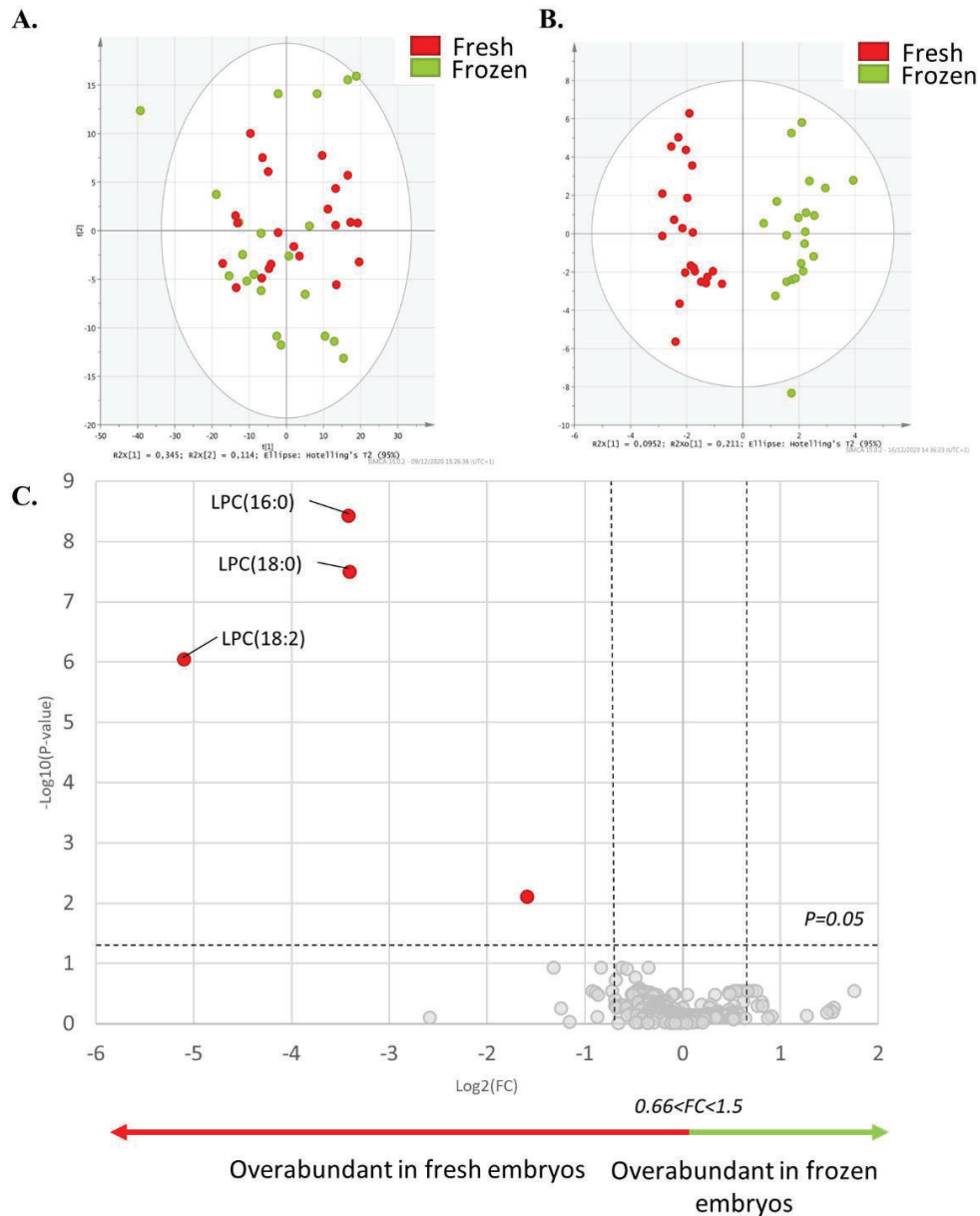


Figure 4. **A.** Principal component analysis (PCA) plot representing variance among *in vitro* fresh and frozen embryos according to principal component analysis. The red dots show data for fresh *in vitro* produced embryos, and the green circles show data for frozen *in vitro* produced embryos. **B.** Multivariate analysis by orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA), discriminating the state before and after freezing (*fresh vs. frozen*) according to the lipid profile of the embryos. **C.** Univariate analysis via volcano plot based on fold-change and *p*-value, highlighted several lipids. Red dots correspond to significantly different lipids between fresh and frozen *in vitro* produced embryos, particularly to those overabundant in fresh embryos, while the grey ones represent the non-significant ones. Statistical significance is determined at $p < 0.05$ and fold-change greater than 1.5 or less than 0.66. Significantly different annotated lysophosphatidylcholine (LPC) are represented on the volcano plot.

Mass spectrometry lipid signature in male and female embryos

To analyse the impact of sex on embryo lipid profiles, all blastocysts were sexed ($n = 80$). The PCA showed overlapping groups between male and female embryos (Figure 5 A.). Sex does not impact lipid profile, in fact, multivariate analysis (O-PLS-DA) showed overlapping groups with a low cross-validated predictive ability (Q^2) of 0.20 and CV-Anova, p -value = 0.0009 (Figure 5 B.). The univariate analysis did not show any difference between male and female embryo lipid profiles (Figure 5 C.).

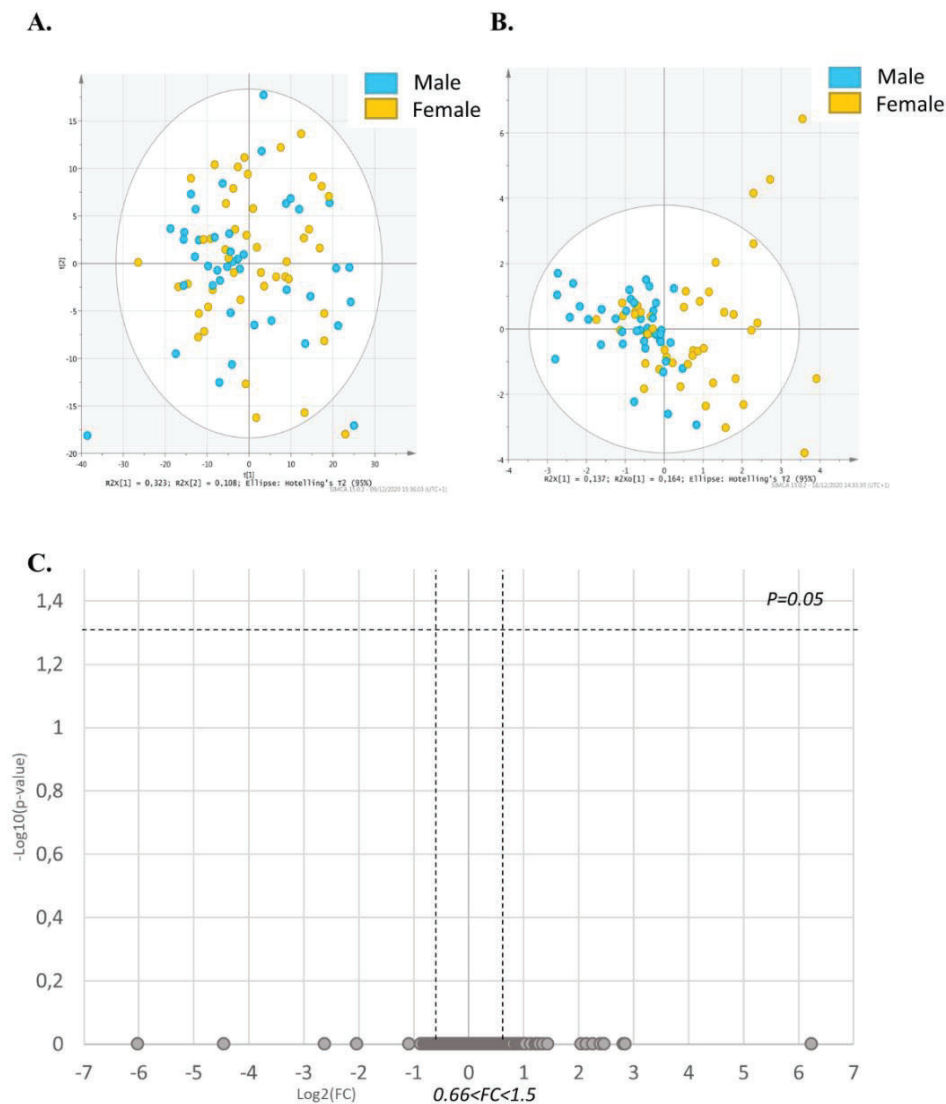


Figure 5. A. Principal component analysis (PCA) plot representing variance among male and female embryos according to principal component analysis B. Multivariate analysis by orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA), discriminating male and female embryos according to their lipid profile. The light-blue dots show data for male embryos, and the yellow dots show data for female embryos. C. Univariate analysis via volcano plot based on fold-change and p -value, did not highlight any lipids. The grey dots represent the non-significant lipids. Statistical significance is determined at $p < 0.05$ and fold-change greater than 1.5 or less than 0.66.

Discussion

This present work is the first, to our knowledge, to evaluate the lipid composition of biopsied embryos, produced either *in vivo* or *in vitro* from the same Holstein heifers before and after slow freezing protocol. The final objective of this approach will be to have an interventional action to improve the lipid profile of *in vitro* embryos. This first step described the differences in embryo lipid profile according to the origin, the freezing/thawing process, and the sex. Our results suggested that embryo lipid profile is mainly impacted by *in vitro* culture protocols and then by the slow freezing process but not by the sex of the embryos.

Lipid profile is greatly modulated by the embryo origin, meaning that *in vitro* culture conditions involve strong modifications in lipid metabolism in comparison with the physiological maternal environment (Figure 6 A.). Multivariate analysis revealed that 314/496 features were included in the fitted model, which means that most of the identified features participated in explaining the lipid profile differences between *in vivo* and *in vitro* produced embryo and not only the significantly different lipids. Indeed, *in vitro* produced embryos are enriched in lipids compared to *in vivo* produced embryos, especially in triglycerides and oxidised glycerophospholipids. The composition of the culture medium can change the amount of fat, in oocytes and embryos, particularly when the serum is added to the medium^{11,21}. Such an increase in triglycerides had previously been reported after *in vitro* culture²². Fergusson and Leese demonstrated that an addition of 10% of serum in the culture medium of four-cell stage bovine embryos led to a significant increase in the triglyceride level. The addition of 5% of foetal calf serum (FCS) in culture media also allows the increase in lipid content, like palmitic, palmitoleic, oleic and stearic acid²¹. Even a low amount of 1% serum, used in the present experiment to produce *in vitro* embryos is sufficient to cause lipid accumulation in embryos. Lipid accumulation can be explained by the absorption of serum lipoproteins²¹, by the neosynthesis of triglycerides due to the presence of serum²³ or by a reduction in the β -oxidation function in the mitochondria, which compromise the embryo ability to properly metabolize lipids^{17,24}. Triglycerides are the major lipid class found in mammalian cytoplasm cells, they are stored as lipid droplets and provide the energy required to support early embryonic development²⁵. Moreover, the overabundance of oxidised glycerophospholipids can also be explained by the *in vitro* culture conditions. In fact, it has been demonstrated that the addition of growth factors, hormones and serum during oocyte maturation stimulated oxidative metabolism and thereby oxidation of fatty acids derived from the breakdown of triglycerides, in the Krebs cycle^{26,27}. Such modulations of the lipid profile are therefore likely related to the *in vitro* culture conditions.

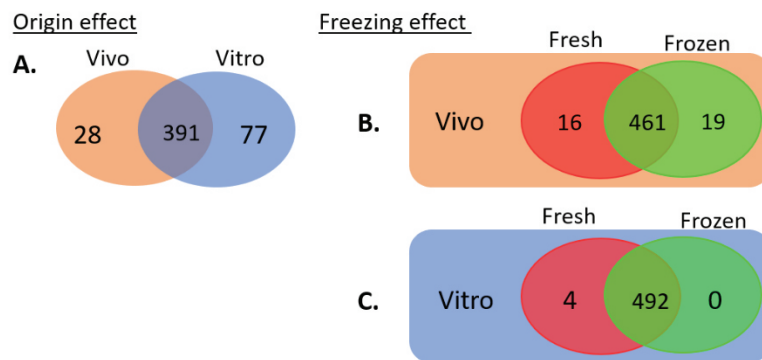


Figure 6. A. Representation of differential lipids between fresh *in vivo* and *in vitro* embryos through a Venn diagram. *In vivo* produced embryos are represented by an orange ellipse and *in vitro* produced embryos are represented by a blue ellipse. **B.** Representation of lipid differentials between fresh (red ellipse) and frozen (green ellipse) *in vivo* produced embryos through a Venn diagram. **C.** Representation of lipid differentials between fresh (red ellipse) and frozen (green ellipse) *in vitro* produced embryos through a Venn diagram.

Large amounts of intracellular lipids can compromise embryo development^{28,29} and survival after the cryopreservation process³⁰. Therefore, the reduction in these lipid amounts has been the subject of considerable effort^{1,2}. Thus, the addition of culture media with the main lipids present in the serum leads to decreased mature oocyte rates and blastocyst rates as well as an increased number of apoptotic cells³¹. In the absence of serum, the first and fourth cell cycles were prolonged by 4-5 h during IVM-IVF, whereas the presence of serum during the culture decreased the duration of the fourth cell-cycle and triggered premature blastulation⁴. One solution may be found in the use of synthetic serum substitute. In fact, phenazine ethosulfate had similar results to those produced by the addition of FCS, while decreasing embryo lipid droplet accumulation when it was added to the embryo culture medium and enhance re-expansion and hatching rate after cryopreservation^{12,32-34}.

An alternative explored by several authors is the deprivation of serum over the last 24 h of embryo culture¹². It is known that serum deprivation represents a stimulus for lipolysis leading to an increase in free fatty acids, and their consumption through β -oxidation for energy production^{35,36}. The addition of lipolytic agents is another non-invasive technique allowing the reduction of the level of intracellular lipid content. Among the lipolytic agents, epinephrine, norepinephrine, isoproterenol, forskolin and others had been used to stimulate intracellular lipolysis by directly acting on components of the lipolysis pathway. It has been highlighted that lipolysis induction by addition of 10 μ M of forskolin in the culture medium of *Bos indicus* embryos 48 h before vitrification significantly increased the pregnancy rates compared to non-supplemented embryos (18.5% vs. 48.8%)³⁷.

In our study, *in vivo* produced embryos are highly enriched in phospholipids, such as phosphatidylinositol, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine. This result is relevant in the literature. Sudano and al. showed that *in vivo* produced embryos exhibited an overabundance in phospholipids, namely phosphatidylcholine, compared to *in vitro* ones³⁸. As indicated by our results, such an increase in phospholipids is not only restricted to phosphatidylcholine. This overabundance of phospholipids appears to be considered as positive biomarker for successful cryopreservation relative to origin³⁸. Phospholipids are the most abundant lipids in the eukaryotic membrane³⁹. Particularly, PC, PE and PI are structural units of the membrane, and their concentration determines most of the physicochemical cell membrane properties, like fluidity, permeability, and thermal phase behaviour⁴⁰. Therefore, the higher cryosensitivity of *in vitro* produced embryos could partly be related to their lower phospholipid content.

The causal link between excess of lipids and reduced cryopreservation is still not fully established yet. Although enriched lipid embryos are less resistant to cryopreservation¹⁴, phospholipids seemed to be important for the cryopreservation process³⁸. By enhancing the phospholipid content of *in vitro* produced embryos through the addition of extracellular vesicles coming from the oviductal fluid, their quality might improve. Banliat and others have shown that extracellular vesicle addition at a concentration of 0.05 mg of proteins/mL in the culture medium induced an overabundance of phospholipids in blastocysts after seven days of culture⁴¹. Nevertheless, in our study, several lipids were not annotated, and it is, therefore, possible that other lipid classes could be affected by the *in vitro* culture process or by the freezing/thawing of the embryos.

In both *in vivo* and *in vitro* produced embryos, fresh embryos are enriched in lysophosphatidylcholine, while only a low amount of those lipids is observed after embryo freezing/thawing. These data suggested that using our slow freezing protocol, LPCs are highly sensitive to cryopreservation. This high sensitivity of LPC is not reported in human plasma, serum, and urine where they seemed to remain stable after several freezing (-20°C)/warming cycle⁴². LPCs are not only sensitive to the slow freezing protocol but also to vitrification⁴³. Indeed, in mice oocytes after vitrification the lysophospholipid content also decreased⁴³. Lysophospholipids allow the production of lysophosphatidic acid by enzymes like phospholipase A1, A2 and autotaxin in the bovine embryos and/or from the bovine endometrial and ovarian cells^{44,45}. In bovine blastocysts, lysophosphatidic acid stimulates the expression of embryo quality markers, such as insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R) and placenta associated 8 (PLAC8) as well as pluripotency factors like sex-determining region Y box 2 (SOX2) and octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), indicating that it can affect bovine embryo quality and support the pluripotency pathway^{46,47}. Therefore, such a decrease in the LPC content could contribute to explaining the decrease in survival rates, total cell numbers and pregnancy

rates of frozen *in vitro* produced embryos after transfer. Interestingly, this abundance of LPC in fresh *in vivo* vs. *in vitro* produced embryo comparison, was not highlighted by univariate analysis. Nevertheless, *in vitro* produced embryos have 1.6 time more LPC than *in vivo* ones. One can speculate that this would be due to *in vitro* culture media as serum contains LPA as previously described⁴⁸. LPA are small molecules that regulate the Hippo pathway via the inactivation of Lats1/2 kinases (large tumor suppressor 1/2) and the decrease in the phosphorylation of YAP/TAZ which would induce their nuclear translocation and would promote cell differentiation via the increase expression of CDX2^{49–51}. If the observed reduction in LPC is related to a decrease in embryo quality and survival, futures studies could focus on the Hippo pathway modulation to improve it.

Because the present paper seems to be one of the first to describe the effect of the freezing step on the embryo lipid profile, we do not have the possibility to discuss our results by comparing them to the literature. Nevertheless, the lipid profiling that we established between *in vivo* and *in vitro* embryos are relevant with the literature and thus give credits to our data that we can't compare. *In vitro* systems seemed to smooth the difference between fresh and frozen embryos. This finding strengthened the hypothesis that the reduction in quality between *in vitro* and *in vivo* embryos relies upon their lipid profile. Considering that *in vitro* embryos already exhibited an impaired lipid profile compared to *in vivo* embryos, the freezing and thawing steps seemed to only mildly affect their lipidome. Indeed, while 35 lipids differed between fresh and frozen *in vivo* produced embryos, only four lipids differed between fresh and frozen *in vitro* produced embryos (Figure 6 B. and C.). Nevertheless, the great reduction in lysophosphatidylcholine evidenced in both cases might indicate the importance of these lipids for the ability to recover from the cryopreservation process. Their specific cryoprotection might be of interest and the cryoprotectant PEG8000 might be a good candidate to assess in future studies as it was able to prevent LPC degradation in murine oocytes after vitrification⁴³.

Metabolic behaviour between male and female bovine embryos differs during the *in vitro* development. For example, amino acid consumption differs between male and female embryos⁵². In fact, valine seems to be more consumed by female than male embryos. This difference would be due to the activation of the X chromosome. In fact, before its activation, no difference in metabolism has been demonstrated between sexes. In our study, the sex of embryos did not have any impact on the lipid profiles of bovine embryos. However, maternal diet, particularly its lipid content, can influence the sex ratio of offspring born to mice where a very high concentration of saturated lipid allowed a deviation of the sex ratio of pups born in favour of males (0.67)⁵³.

The originality of our study is that it makes possible to prioritize the factors impacting the embryo lipid profile. In this way, future studies should focus on culture conditions and freezing protocols to

modify the lipid profile of bovine embryos, but not in a sex dependent way. The novelty also lies in the fact that we analysed the embryos individually which made it possible to have a more precise embryonic lipid profile and to highlight the interindividual variability. Performing the analysis on heifers makes it possible to overcome the metabolic and reproductive disturbances linked to milk production interfering with reproductive performance⁵⁴. This analysis made it possible to compare the entirety of the lipid profiles of each group, but one of the limitations of this technique is that many of the differentially identified lipids are not annotated and are therefore unknown at the present. The discussion of the results was focused on the lipids that could be annotated. Another limitation is the reduced number of donors. Indeed, the interindividual variation can be high between donors. Nevertheless, to limit this bias a Latin square design was used allowing the donors to be similarly represented in each group.

In addition to the optimisation of the *in vitro* culture process, studies should also aim to optimise the freezing protocol, so that it exhibits a lower impact on the lipid profile of the embryo. For example, a freezing media preventing the degradation of lysophospholipids could contribute to improving the freezing protocol⁴⁷. Further studies are necessary to investigate the relationship between lipids and both embryo quality and sensitivity to cryopreservation.

Author contributions

P.S., D.L.B., L.S., T.J., S.B. and P.E. conceived the experiment(s), S.J.I., D.L.B., O.D., L.L.B. and A.L. conducted the experiment(s), S.J.I. analysed the results. S.J.I. and S.E. wrote the main manuscript text. S.I.J., S.E., P.S., D.L.B., L.S., P.E., L.L.B., O.D., A.L., V.M., T.J. and S.B. reviewed the manuscript.

Funding

This research was funded by ALLICE and APIS-GENE under the project CRYOPTIM.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90870-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.J.I.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative

Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third-party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

References

1. Ponsart, C. *et al.* Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **26**, 12–21 (2013).
2. Agca, Y. *et al.* Normal calves from transfer of biopsied, sexed, and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* **50**, 129–145 (1998).
3. De Sousa, R. V. *et al.* Biopsy of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* does not affect pregnancy rates. *Theriogenology* **90**, 25–31 (2017).
4. Holm, P., Booth, P. J. & Callesen, H. 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* **123**, 553–565 (2002).
5. Hasler, J. F. *et al.* Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* **43**, 141–152 (1995).
6. van Wagtenonk-de Leeuw, A. M. *et al.* Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* **53**, 575–597 (2000).
7. Khurana, N. K. & Niemann, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* **62**, 847–856 (2000).
8. Lonergan, P. *et al.* Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* **71**, 1096–1100 (2004).
9. Baumann, C. G., Morris, D. G., Sreenan, J. M. & Leese, H. J. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol. Reprod. Dev.* **74**, 1345–1353 (2007).
10. Feugang, J. M., Camargo-Rodríguez, O. & Memili, E. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science* **121**, 141–149 (2009).
11. Thompson, J. G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* **45**, 27–40 (1996).
12. Sudano *et al.*, M. J. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=lipid+content+and+apoptosis+of+in+vitro+produced+bovine+embryos+as+determinants+of+suceptibility> (2011).
13. Rizos, D. *et al.* Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* **68**, 236–243 (2003).
14. Amstislavsky, S., Mokrousova, V., Brusentsev, E., Okotrub, K. & Comizzoli, P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. *Biopreserv Biobank* **17**, 76–83 (2019).
15. Arav, A. *et al.* Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8975686> (1996).
16. Pereira, R. M. & Marques, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=animal+oocyte+and+embryo+cryopreservation+Cell+tissue+bank> (2008).

17. 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.* **61**, 57–66 (2002).
18. Papadopoulos, S. *et al.* Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* **74**, 35–44 (2002).
19. Men, H., Agca, Y., Riley, L. K. & Critser, J. K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* **66**, 2008–2016 (2006).
20. Seidel, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263160> (2006).
21. 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. *Journal of Reproduction and Development* **45**, 97–103 (1999).
22. Sudano, M. J. *et al.* Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology* **86**, 472-484.e1 (2016).
23. I.M, A. *et al.* Difference in lipid composition between *in vivo*-and *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* **53**, 346 (2000).
24. Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E. & Farin, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod* **64**, 1375–1385 (2001).
25. Sturmey, R. G., Reis, A., Leese, H. J. & McEvoy, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim* **44 Suppl 3**, 50–58 (2009).
26. Rieger, D. *et al.* 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*. *J Reprod Fertil* **112**, 123–130 (1998).
27. Ferguson, E. M. & Leese, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* **116**, 373–378 (1999).
28. Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Van Knegsel, A. T. M., Garcia-Ispierto, I. & Bols, P. E. J. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility? *Reprod Domest Anim* **43 Suppl 2**, 96–103 (2008).
29. Desmet, K. L. J. *et al.* Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts. *BMC Genomics* **17**, 1004 (2016).
30. Marsico, T. V., de Camargo, J., Valente, R. S. & Sudano, M. J. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Anim Reprod* **16**, 423–439 (2019).
31. Leroy, J. L. M. R. *et al.* Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction* **130**, 485–495 (2005).
32. Ordoñez-Leon, E. A., Merchant, H., Medrano, A., Kjelland, M. & Romo, S. Lipid Droplet Analysis Using *in vitro* Bovine Oocytes and Embryos. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24467659/?from_term=bovine+embryo+lipid&from_pos=2 (2014) doi:10.1111/rda.12275.

33. Ghanem, N. *et al.* Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology* **82**, 238–250 (2014).
34. Batista, R. I. T. P. *et al.* Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of *in vitro*-produced crossbred bovine embryos. *J Anim Sci Biotechnol* **5**, 33 (2014).
35. Gómez, E. *et al.* Protein in culture and endogenous lipid interact with embryonic stages *in vitro* to alter calf birthweight after embryo vitrification and warming. *Reprod. Fertil. Dev.* **29**, 1932–1943 (2017).
36. Singh, R. *et al.* Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**, 1131–1135 (2009).
37. Sanches, B. V. *et al.* Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived Bos indicus embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology* **80**, 372–377 (2013).
38. Sudano, M. J. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in Bos taurus indicus and Bos taurus taurus *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol Reprod* **87**, 130 (2012).
39. Harayama, T. & Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 281–296 (2018).
40. Edidin, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 414–418 (2003).
41. Banliat, C. *et al.* Oviduct Fluid Extracellular Vesicles Change the Phospholipid Composition of Bovine Embryos Developed *In vitro*. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
42. Peng, Z. *et al.* A rapid quantitative analysis of bile acids, lysophosphatidylcholines and polyunsaturated fatty acids in biofluids based on ultraperformance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem massspectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1068–1069**, 343–351 (2017).
43. Jung, G. T. *et al.* Lipidomic changes in mouse oocytes vitrified in PEG 8000-supplemented vitrification solutions. *Cryobiology* **99**, 140–148 (2021).
44. Aoki, J. *et al.* Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* **277**, 48737–48744 (2002).
45. Woclawek-Potocka, I., Brzezicka, E. & Skarzynski, D. J. Lysophosphatic acid modulates prostaglandin secretion in the bovine endometrial cells differently on days 8-10 of the estrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Dev* **55**, 393–399 (2009).
46. Boruszewska, D., Sinderewicz, E., Kowalczyk-Zieba, I., Grycmacher, K. & Woclawek-Potocka, I. Studies on lysophosphatidic acid action during *in vitro* preimplantation embryo development. *Domest. Anim. Endocrinol.* **54**, 15–29 (2016).
47. Boruszewska, D., Sinderewicz, E., Kowalczyk-Zieba, I., Grycmacher, K. & Woclawek-Potocka, I. The effect of lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte, and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol* **13**, 44 (2015).
48. Choi, J. W. *et al.* LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 157–186 (2010).
49. Qin, H. *et al.* YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Rep* **14**, 2301–2312 (2016).
50. Yu, F.-X. *et al.* Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* **150**, 780–791 (2012).

51. Nishioka, N. *et al.* The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* **16**, 398–410 (2009).
52. Rubessa, M., Ambrosi, A., Gonzalez-Pena, D., Polkoff, K. M. & Wheeler, M. B. Non-invasive nuclear magnetic resonance analysis of male and female embryo metabolites during *in vitro* embryo culture. *Metabolomics* **14**, 113 (2018).
53. Rosenfeld, C. S. *et al.* Striking variation in the sex ratio of pups born to mice according to whether maternal diet is high in fat or carbohydrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4628–4632 (2003).
54. Chagas, L. M. *et al.* Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* **90**, 4022–4032 (2007).
55. Freret, S. *et al.* Effects of a n-3 PUFA enriched diet on embryo production in dairy cows. *Reproduction* (2019) doi:10.1530/REP-18-0644.
56. Konishi, M. *et al.* Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* **45**, 573–581 (1996).
57. Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. & First, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* **38**, 1171–1180 (1988).
58. Cotinot, C., Kirszenbaum, M., Leonard, M., Gianquinto, L. & Vaiman, M. Isolation of bovine Y-derived sequence: potential use in embryo sexing. *Genomics* **10**, 646–653 (1991).
59. Le Bourhis, D. *et al.* Nuclear transfer from sexed parent embryos in cattle: efficiency and birth of offspring. *J. Reprod. Fertil.* **113**, 343–348 (1998).
60. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13671378> (1959).
61. Beauclercq, S. *et al.* Does lipidomic serum analysis support the assessment of digestive efficiency in chickens? *Poult Sci* **98**, 1425–1431 (2019).
62. Want, E. J. *et al.* Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Global+metabolic+profiling+of+animal+and+human+tissues+via+UPLC-MS> (2012).
63. Fahy, E. *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **50** Suppl, S9-14 (2009).
64. Fahy, E. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **46**, 839–861 (2005).
65. Barker, M. & Rayens, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics* **17**, 166–173 (2003).

Conclusions et perspectives

Pour l'évaluation du profil lipidique des embryons, 8 génisses ont permis la production d'embryons *in vivo* et *in vitro* par OPU-FIV selon un dispositif en carré latin permettant de s'affranchir de la variabilité individuelle et du rang de production. L'analyse en spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence des différences de profils selon le type d'embryons (*in vivo* vs. *in vitro*), les embryons PIV étant plus riches en lipides, en particulier en triglycérides et en glycérophospholipides oxydés, et présentant un déficit en certains glycérophospholipides, notamment en phosphatidyl inositol, serine, glycérol et éthanolamine. Les phospholipides jouant un rôle essentiel dans la fluidité, la perméabilité et le comportement des membranes cellulaires eucaryotes lors des changements de phase, les différences observées pourraient expliquer en partie la diminution des taux de survie post décongélation des embryons PIV même si la relation de cause à effets est difficile à démontrer. Par ailleurs, le processus de congélation lente modifie également le profil lipidique. Il a été observé une diminution du contenu en lysophosphatidylcholine (LPC) post décongélation, quel que soit le type d'embryons. Les LPC sont des précurseurs de l'acide lysophosphatidique dont le rôle dans l'induction et le maintien de la pluripotence des cellules de l'embryon préimplantatoire a été démontré, ce qui pourrait en partie expliquer la réduction du potentiel de développement des embryons congelés. Le sexe des embryons ne semble lui pas avoir d'impact sur leur composition lipidique. Ces résultats justifient pleinement les axes de travail ultérieurs de la thèse puisqu'ils soulignent l'importance d'optimiser les conditions de production de et cryoconservation des embryons sans adopter une approche sexe spécifique.

Afin d'évaluer si des changements dans le système de production impactent également le profil lipidique des embryons, différentes analyses ont été réalisées à partir d'embryons produits par OPU-FIV :

- **Comparaison de deux systèmes d'élevage** avec les embryons produits à partir des vaches en lactation du projet Bovomega 3 vs. ceux produits avec les génisses utilisées en tâche 1.1. Outre la parité, cette comparaison intègre également des différences au niveau de la conduite alimentaire des animaux mais également au niveau des conditions de production qui, même si les protocoles étaient identiques, comprennent des changements au niveau des lots de produits utilisés.

- **Comparaison de deux protocoles de congélation lente** utilisés pour la congélation de blastocystes expansés bovins avec un protocole utilisant du Glycérol-Tréhalose vs. un protocole utilisant de l'EG-Sucrose. L'étude précédente a démontré que le processus de congélation lente impacte le profil lipidique embryonnaire notamment par la diminution des LPC. Comparer l'impact de deux protocoles de congélation lente différents permettra de vérifier si, selon les cryoprotecteurs et la courbe de température utilisée, la congélation peut agir différemment sur le profil lipidique embryonnaire.
- **Comparaison de deux régimes alimentaires** à partir des vaches en lactation utilisées dans la projet Bovomega 3 et supplémentées dans leur alimentation en acide gras de type oméga-3 ou oméga-6. Les résultats obtenus permettront de connaître l'intérêt d'une supplémentation alimentaire en oméga 3 dans l'alimentation des femelles donneuses sur le profil lipidique embryonnaire après OPU-FIV.

4. *Article 2. Effects of the donor factors and freezing protocols on the bovine embryonic lipid profile*

Sarah Janati Idrissi ^{1*}, Daniel Le Bourhis ¹, Antoine Lefevre ², Patrick Emond ^{2,6}, Laurene Le Berre ¹, Olivier Desnoës ¹, Thierry Joly ^{3,4}, Samuel Buff ⁴, Sandrine Freret ⁵, Laurent Schibler ¹, Pascal Salvetti ¹, Sébastien Elis ^{5*}

1 Alice, 37380 Nouzilly, France;

2 Université de Tours, PST Analyse des systèmes biologiques, 37044 Tours Cedex 9, Tours, France;

3 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA-Lyon, UPSP ICE 2021.A104, F-69007 Lyon, France

4 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, VetAgro Sup, UPSP ICE 2021.A104, F-69280 Marcy l'Etoile, France;

5 CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, 37380 Nouzilly, France

6 CHRU Tours, Medical Biology Center, 37000 Tours, France

* Correspondance: sarah.janati-idrissi@alice.fr

Published: 29/10/2021

Journal: *Biology of Reproduction*, ioab198

The article and all supplementary data are available online in open access by following this link:

<https://doi.org/10.1093/biolre/ioab198>

Abstract

Embryo lipid profile is affected by *in vitro* culture conditions, that lead to an increase in lipids. Efforts have been made to optimize embryo lipid composition as it is associated with their quality. The objective of this study was to evaluate whether the diet supplementation of donor cows (n-3 or n-6 PUFA), or the slow freezing protocols (ethylene glycol sucrose EG-S vs. glycerol trehalose GLY-TRE), or the physiological stage of the donor (nulliparous heifers vs. primiparous lactating cows) may impact the bovine embryo lipid profile. Lipid extracts of 97 embryos were individually analysed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, highlighting 246 lipids including 85% being overabundant in cow embryos compared to heifer embryos. Among 105 differential lipids, 72 were overabundant after EG-S protocol, including a single glycerophosphate PA(32:1) representing 27,3% of the significantly modulated lipids, suggesting that it is degraded when GLY-TRE is used. No lipids were different according to the n-3 or n-6 supplementation of the donor cows. In conclusion, the embryonic lipid profile was mainly affected by the physiological stage of the donors and the slow freezing protocols. The overabundance of lipids in lactating cow embryos and the resulting lower quality of these embryos is consistent with the lower pregnancy rate observed in cows compared to heifers. Unlike GLY-TRE protocol, EG-S freezing allowed to preserve glycerophospholipids potentially improving the slow freezing of *in vitro*-produced embryos. Further studies are required to modulate embryo quality and freezability by modulating the lipidome and integrating all stages of embryonic production.

Key words: cryopreservation; embryo quality; lipidomic; N-3 PUFA; ; *in vitro* embryo production; bovine

Introduction

Lipid composition is an important factor in ensuring proper embryonic development and thus achieving high pregnancy rates (1,2). Moreover, it has been shown that the embryonic origin (*vivo* or *vitro*) as well as embryo freezing had a significant impact on the lipid profile of bovine embryos (3). In fact, *in vitro*-produced embryos seemed to present an overabundance of oxidised glycerophospholipids and triglycerides, while the *in vivo* ones had an overabundance of phospholipids. An overabundance of phospholipids, particularly phosphatidyl choline, appears to be considered a positive biomarker for successful cryopreservation (4). These differences contribute to the lower quality of *in vitro*-produced embryos (5). Indeed, an *in vitro* culture system induces lipid droplet accumulation in blastomeres. This phenomenon is responsible for a higher cryo-susceptibility (6,7) and it also stimulates the oxidative metabolism and thereby the oxidation of fatty acids (FA) derived from the breakdown of triglycerides by the addition of growth factors hormones and serum during embryo culture (8,9). Preserving phospholipids therefore seems to be of interest to improve embryo quality.

Given the importance of the embryonic lipid profile, several authors have tried to modulate it by supplementing the donor cow diet that is modifying PUFA intake in cows. It has already been demonstrated that n-3 PUFA supplementation has beneficial effects on dairy cow reproduction (10). In fact, addition of n-3 PUFA (alpha-linolenic acid ALA, eicosapentaenoic acid EPA, docosahexaenoic acid DHA) in the cow diet led to 8% reduction in the embryo mortality rate (11) and tended to increase the conception rate by reducing prostaglandin F2 alpha (PGF2 alpha) levels and therefore pregnancy losses (12,13). Recently, Freret et al. (14) demonstrated that a short period of supplementation with n-3 PUFA in cow diet was sufficient to induce variations in plasma and follicular fluid FA composition. Such n-3 PUFA supplementation led to changes in the oocyte phospholipid composition, particularly in phosphatidylcholine and sphingomyelin, which are major components of cell membranes and involved in membrane structure stabilization (14,15). Indeed, phospholipid composition and especially the level of unsaturation in glycerophospholipid and the amount of cholesterol in the membrane can affect the resistance of membrane during cryopreservation and its elasticity (16,17). The higher the membrane fluidity, the better the cryopreservation survival would be (17). Indeed, during cooling, the molecular motion in the membrane lipid bilayer decreases, allowing interaction between lipid molecules and affecting fluidity and functioning of the membrane. The addition of DHA (1 μ M) directly into bovine oocyte maturation medium increased the rates of cleaved embryos and day 7 blastocysts and tended to increase the total cell number per blastocyst (18). This addition also induced a decrease in lysophosphatidylcholine LPC, the precursor of lysophosphatidic acid, a change that could explain

some of the beneficial effects reported regarding oocyte quality (19).

Cryopreservation of *in vitro*-produced embryos is a crucial step limiting the spread of valuable high-merit animals (20). The freezing protocol can damage membrane integrity by causing membrane-chilling injuries (21,22). In fact, the lipid phase transition, followed by separation, is one of the major causes of cryo-damages in lipid-rich oocytes and embryos (21,23). It has also been shown that embryo and oocyte cryopreservation protocols (slow freezing and vitrification) lead to a decrease in the phospholipid and LPC content (3,24). However, LPCs are precursors of lysophosphatidic acid, which is a modulator of embryos quality markers such as insulin-like growth factor 2 receptor (IGFR2) and placental associated 8 (PLAC8) as well as pluripotency factors like sex-determining region Y box 2 (SOX2) and octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), indicating that a decrease in LPC content can affect bovine embryo quality and lead to a dysregulation of pluripotency pathway (25,26).

Most slow freezing media contain sugars, such as trehalose, sucrose and glucose that help maintain the integrity of membrane proteins. Trehalose addition in media improves cryopreservation of mammalian cells, especially oocytes (27,28). Membrane proteins protect the lipids from an increase in temperature during the lipid phase transition that occurs during chilling and decrease the size of ice crystals (29,30). Membrane permeability properties are affected by chilling process and by cryoprotectants. This increase in permeability would induce the absorption of membrane impermeable molecules like trehalose (31). Disaccharide uptake during freezing protocols facilitates intracellular protection, stabilizing cells during cryopreservation (32) and reduces chromatin degradation during storage (33). Non-lactating Holstein heifers present higher rates of good-quality embryos and blastocysts compared to lactating Holstein cows (34,35). Indeed, only 13,1% of lactating Holstein cows embryos were categorised as excellent compared with 62,5% of the non-lactating Holstein heifers' embryos. Moreover, non-lactating Holstein heifers exhibited paler embryos, meaning they had a lower lipid content (34). On the contrary, the reduced reproductive performance of lactating cows observed over the last decades is a phenomenon associated with intense genetic selection aiming to increase milk production (36,37), an approach that is closely related to energy balance (38). High milk yield requires high dietary intake and altered peripheral concentrations of metabolic hormones like insulin-like growth factor 1 (IGF1) and insulin, and metabolites that are associated with subfertility through an altered follicular function resulting in delayed ovulation (39). Indeed, high genetic merit cows presented a decrease in serum glucose, IGF-1, and insulin concentrations, from 15 days post-partum (39), suggesting that high merit cows had a lower energy balance than low merit cows (40,41). However, IGF-1 regulates the sensitivity/response of follicles to gonadotropin hormones and may influence follicle development

and oocyte maturation (42). Lactating cows present a reduction in peak circulating oestradiol (E2) and an increased size of the ovulatory follicle compared to nulliparous heifers. Those parameters could lead to shorter or less intense oestrus behaviour, poor fertilisation, poor early embryonic development and to a tendency to increase pregnancy loss (43).

We therefore hypothesised that the embryonic lipid profile is altered by lipid supplementation given to the donor cow, a change in the slow freezing protocol or according to the physiological stage of the donor. Thus, the objectives of this study were to evaluate, using mass spectrometry, the lipid content of single bovine grade 1 expanded blastocysts from cows that had been supplemented with n-3 PUFA. The embryonic lipid profiles from heifers versus lactating cows were also evaluated. Finally, the effect of two slow freezing protocols on the embryonic lipid profiles were assessed.

Methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise stated.

Experimental design

All experimental protocols were conducted following the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the French Ministry of National Education, Higher Education, Research, and Innovation after ethical assessment by the local ethics committee 'Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Val de Loire' (protocols registered under APAFIS, numbers 20013-2019032818243107v2 and 2098- 2015100115278976_v5). The present study is also in accordance with the ARRIVE guidelines. Experiment 1: To assess the effects on the embryonic lipid profile of PUFA supplementation in the donor diet, embryos were produced by ovum pick-up followed by *in vitro* fertilisation (OPU-IVF) from Holstein primiparous cows that were supplemented with either n-3 PUFA (fish oil) or n-6 PUFA (soy oil = control) in their diet (14). OPU-IVF were performed at an average of 114.3 ± 17.6 - and 123.5 ± 15.6 -days post-partum for respectively n-3 and n-6 cows. Three OPU-IVF sessions were carried out on 12 n-3 cows and 10 control n- 6 cows, corresponding to 2, 5 and 7 weeks of PUFA supplementation, respectively. This procedure allowed the production of 113 Q1 expanded blastocysts, at the rate of about 20 embryos per week (Table 1). As described by Freret et al., (14), an impregnation of the follicular fluid and therefore a change in the lipid profile of the oocytes were observed after 5 weeks of supplementation of donor females. However, an increase in transferrable embryos (Q1-Q2 blastocyst) was noticeable after 2 weeks of supplementation. Considering this effect, a total of 27 n-3 and 29 n-6 embryos have been selected from 10 to 12 different cows submitted to OPU-IVF at 2, 5 and 7 weeks of PUFA

supplementation. In this study the lactating cows are the same that the cows used by Freret et al. (14), for the analysis of oocyte lipid profile and follicular fluid.

Experiment 2 : Seven Holstein heifers were subjected to oocytes collection by OPU-IVF. Heifers were 43.6 ± 2.0 months old and weighed 527.7 ± 15.5 kg at the time of embryos production. To avoid any individual effects, the same 7 Holstein heifers underwent an average of 2.6 ± 0.4 OPU-IVF sessions to obtain about 20 expanded grade-1 slow frozen blastocysts according to 2 different slow freezing protocols, glycerol-trehalose (GLY-TRE, n = 19) and ethylene glycol-sucrose (EG-S, n = 22) at the rate of about 11.2 embryos per week.

Experiment 3 : To evaluate the impact of the donor metabolic status on the embryonic lipid profile, embryos produced by OPU-IVF from the heifers from experiment 2 were compared to embryos produced by OPU-IVF from the lactating cows supplemented with n-6 PUFA from experiment 1. OPU-IVF of lactating cows were performed in 2015-2016 while the OPU-IVF of heifers were performed in 2019. All embryos were preserved in liquid nitrogen and all the lipid extractions were performed in 2019.

Animal feeding management

Experiment 1: Each Holstein lactating cows received a diet supplemented with n-6 or n-3 PUFA for 9 weeks, starting approximately 11 weeks after calving (14). Briefly, cows were fed with a basic diet described in the (Supplementary Table 1).

The PUFA supplements were added to the above diets. The supplements were OMG750[®], a n-3 PUFA microencapsulated fish oil (Kemin, Nantes, France), and OMGSOY[®], a microencapsulated n-6 PUFA soy oil (Kemin, Nantes, France). They were distributed at 1% of the total dry matter. Cows were fed ad libitum.

Experiment 2: Each Holstein heifer were fed with straw ad libitum complemented with 5kg of concentrate (Floria, Sanders, Bruz, France) distributed twice over the day (2,5kg portion), described in the (Supplementary Table 1)

Oestrus synchronisation

Experimental heifers were subjected to oestrus synchronisation, as described by Janati Idrissi et al. (3). Briefly synchronisation treatments were performed by insertion of an intravaginal progesterone

releasing device (Prid® Delta, 1.55g, Ceva, Libourne, France) and followed, six days later, by 2 mL intramuscular injection of a prostaglandin F2 alpha analogue (Estrumate®, MSD Santé Animale - Intervet, Beaucouzé, France; equivalent to 0.5 mg cloprostenol). The removal of the intravaginal device was performed 24 h after cloprostenol injection. Reference heat was detected by the monitoring of activity and rumination (Heatime®, Evolution XY, Noyal-Sur-Vilaine, France) of heifers around 48h after intravaginal device removal. Dominant follicles (follicles with a diameter > 8 mm) were ablated between 8 and 12 days later.

Experimental cows were also subjected to synchronization and ovarian stimulation, as described by Freret et al. (14). Briefly, each cow received a synchronisation treatment consisting of a 3.3 mg norgestomet subcutaneous implant (Crestar SO®, MSD Santé Animale, Beaucouzé, France) and intramuscular injection of 0.001 mg buserelin (Crestar Pack®, MSD Santé Animale, Beaucouzé, France). Seven days later, each cow received an intramuscular injection of 15 mg of PGF2a (Prosolvlin®, Virbac, Carros, France) and two days later, the subcutaneous implant was removed. Reference heat was detected by the monitoring of activity and rumination (Heatime®) of cows around 48h after subcutaneous implant removal. The oestrus corresponded to the first day of supplementation, and a new subcutaneous implant of 3.3 mg norgestomet was inserted on that day. In this way, every 10 days, the subcutaneous implant was replaced, and this until the end of the protocol, to prevent the occurrence of oestrus between OPU sessions.

***In vitro* embryo production**

For Holstein heifers, ovarian stimulation was performed as previously described (3) 36 h after the removal of the dominant follicles. Briefly, a new intravaginal progesterone device (Prid® Delta, 1.55g, Ceva, Libourne, France) was inserted, and the ovarian stimulation was performed by five intramuscular injections of decreasing porcine Follicle Stimulating Hormone/ porcine Luteinizing Hormone (pFSH/pLH) doses (Stimulfol®, Reprobio, Ouffet, Belgium), every 12h, over 2.5-days.

- Day 0.5: 7 p.m–75 µg FSH/15 µg LH
- Day 1: 7 a.m–62.5 µg FSH/12.5 µg LH
- Day 1: 7 p.m–50 µg FSH/10 µg LH
- Day 2: 7 a.m–37.5 µg FSH/7.5 µg LH
- Day 2: 7 p.m–25 µg FSH/5 µg LH

For Holstein lactating cows, ovarian stimulation was performed as described by Freret et al. (14), by five intramuscular injections of decreasing pFSH/pLH doses (Stimulfol®, Reprobio, Ouffet, Belgium),

every 12h, over 2.5-days.

- Day 0.5: 7 p.m.–112 µg FSH/22.4 µg LH
- Day 1: 7 a.m.–100 µg FSH/20 µg LH
- Day 1: 7 p.m.–75 µg FSH/15 µg LH
- Day 2: 7 a.m.–63 µg FSH/12.6 µg LH
- Day 2: 7 p.m.–50 µg FSH/10 µg LH

Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected by OPU. After locoregional anaesthesia, follicles from both ovaries, from 6 to 12 mm in diameter, were aspirated, by transvaginal way, using ultrasonography, and COCs were recovered in a tube, containing 1 mL of flushing solution (Euroflush®; IMV Technologies, L'Aigle, France) added with heparin (1:50), maintained at 37°C.

***In vitro* development**

In vitro development was performed as previously described (3). Whatever the groups, 82 to 90% of the recovered COCs were selected. The recovered COCs were selected under a stereomicroscope and only COCs with homogenous, non-granular cytoplasm and having at least three layers of granulosa cells were used (44). The COCs were matured in *in vitro* maturation medium, which consisted in TCM-199, supplemented with, 10 µg/mL pFSH/pLH, 1 µg/mL 17-beta-œstradiol, 5 ng/mL epidermal growth factor 5 µg/mL gentamicin and 10% foetal calf serum (FCS) (v/v). All COCs were incubated at 38.5°C for 22 h under a maximum humidity atmosphere of 5% CO₂ in the air. Matured oocytes were fertilised in 500 µL of a modified Tyrodé's bicarbonate buffered solution containing 10 µg/mL heparin, 20 µM penicillamine, 10 µM hypotaurine, 1 µM epinephrine, 6 g/L BSA and 20 µM sodium pyruvate (45). A single ejaculate from one bull (FR1532181070, Evolution cooperative, Noyal-Sur-Vilaine, France) of proven fertility was used for all the IVF experiments for fertilization of COCs from both lactating cows and heifers. Spermatozoa were coincubated with COCs at 1 x 10⁶ spermatozoa/mL at 38.5°C for 18 h in a maximal humidified atmosphere of 5% CO₂ in the air. After fertilisation, cumulus cells and spermatozoa were removed from presumptive zygotes. Zygotes were cultured in a 30 µl micro drop of synthetic oviductal fluid (SOF, Minitüb, GmbH, Germany) supplemented with 1% of oestrus cow serum, 2% Minimum Essential Medium (MEM) 100x containing non-essential amino acids, 1% Basal Medium (BME) 50x containing essential nutrients, 0.33 g/L Na-Pyruvate and 6 g/L FA free BSA at 38.5°C in a maximal humidified atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ and covered with mineral oil (Liquid Paraffin, Origio, Måløv, Denmark). Cleavage rates were assessed under stereoscopic microscopy 48 h post-fertilisation (day 2). Blastocyst

development rates and embryo quality were recorded at day 6 and day 7 according to the International Embryo Technology Society morphological criteria (Chapter 9 and Annex D, IETS Manual, 3rd edition). Only grade-1 expanded blastocysts were used for the experiment, that is, expanded blastocysts with a compact inner cell mass, uniformly coloured blastomeres, few irregularities or excluded cells and an intact and smooth zona pellucida. Wilcoxon tests were carried out to compare the numbers of embryos at the different stage of development and Chi2 tests were carried out on the percentages of embryos development at different stage (Table 1).

Embryo Freezing

Ethylene Glycol Sucrose protocol

The embryos were frozen in EG-S solution, following a protocol previously described (3). Briefly embryos were washed in Embryo Holding Medium (EHM, IMV Technologies, L'Aigle, France) and placed in 1.5 M ethylene glycol embryo freezing medium containing BSA (ET freezing media, IMV, Technologies, L'Aigle, France) with 0.1 M sucrose added. The embryos were individually mounted in 250- μ L straws. Straws were placed in the cryochamber of the freezer (Freeze Control[®], Cryologic, Melbourne, Australia), previously equilibrated at -6°C. After 2 minutes, the seeding was manually induced. The temperature was stabilised at -6°C for 8 minutes post-seeding and then dropped to -32°C at a rate of -0.3°C/min. The entire protocol, from the moment the straws were placed in the cryochamber, until the freezer has stabilised at -32°C, lasts 96 min.

Glycerol Trehalose protocol

Embryos were washed in EHM and placed in dehydration solution composed of EHM added with 20% FCS, 5% glycerol during 10 min (solution 1). Embryos were then placed in freezing solution composed of EHM added with 20% FCS, 9% glycerol and 0.2 M trehalose during 10 min (solution 2). During this time, the embryos were mounted in 250- μ L straws respecting the following proportion 4:2:4. Specifically, the first column was composed of solution 1, the second contain embryos in the solution 2 and the third column was composed of solution 1. The straws were placed in the cryochamber of the freezer (Freeze Control[®], Cryologic, Melbourne, Australia) at room temperature. The temperature was dropped to -7°C at a rate of 1.5°C/min, and was stabilised at -7°C during 3 min. The seeding was manually induced, and the temperature remained at -7°C for an additional 3 min. Then, temperature dropped to 32°C at a rate of -0.3°C/min. The entire protocol, from the moment the straws were placed in the cryochamber, until the freezer has stabilised at -32°C, lasted 110 min.

At the end of both programs, the straws were directly plunged in liquid nitrogen and stored before thawing and lipid extractions. For thawing, whatever the cryopreservation protocol used, straws

were kept 5 s in ambient air and then immersed in a water bath at 35°C for 30 s. Embryos were washed three times in PBS and transferred in 1.5-mL vials in minimum volumes for lipid extractions.

Lipid analysis by mass spectrometry, sample preparation and data acquisition

Liposoluble extraction and lipid analysis by mass spectrometry were performed as previously described (3). Briefly, liposoluble fraction of each embryo was extracted by methanol/chloroform protocol. The lower phase (350 μ L) corresponding to the nonpolar fraction was recovered and put in glass tubes for solvent evaporation using a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The residue was then reconstituted with 100 μ L of a 6:3:1 mix of acetonitrile (ACN)/water/isopropanol followed by centrifugation for homogenisation before mass spectrometry analysis.

LC-HRMS was performed in positive ionisation mode (ESI+) using an UPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Germany), coupled to a QExactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The autosampler temperature was set at 4°C, and the injection volume for each sample was 5 μ L. During the full-scan acquisition, the instrument operated at 70,000 resolution, which ranged from 250 to 1600 m/z, with an automatic gain control target of 1×10^6 charges and a maximum injection time of 250 ms. The instrumental stability was evaluated by multiple injections (n = 9) of a quality control (QC) sample obtained from a pool of 10 μ L of all samples analysed. This QC sample was injected once at the beginning of the analysis, then after every 10 injections and at the end of the run.

LC-HRMS data processing and statistical analysis

Data processing and statistical analysis were performed as previously described (3). Briefly, Galaxy Workflow4metabolomics was used to process the raw data for the detection of features and retention time correction. Considering all the samples of an analytical campaign, features with QC variance greater than sample variance and variance intensities > 30% in QC samples were removed as well as those identified as background noise or poorly integrated after visual inspection (46). For all the remaining features, lipid annotation was performed on SimLipid®. The peak intensities were normalised by the sum of the areas of the features considered, transformed into a logarithm using the automatic transformation tool of SIMCA® software (Umetrics, Umeå, Sweden). Lipids were annotated (<0.01 ppm) according to either the homemade SimLipid® (highlighted in yellow in Supplementary Table 2) database or to the LIPID MAPS® Lipid Classification System (47,48) (not highlighted in Supplementary Table 2).

(https://www.lipidmaps.org/resources/tools/bulk_structure_searches.php?database=LMSD).

Principal component analysis (PCA) was performed on the data as exploratory unsupervised analysis representing the distribution of the embryos for the different comparisons, according to their entire lipid profile. PCA allowed to observe the distribution of embryos according to their lipid profile, without supervision and allows a visual description of the results. Multivariate analysis was performed with orthogonal partial least square (O-PLS-DA), which were performed on the data set in the form of supervised analysis to predict groups

by maximising the explained variance between groups, using the SIMCA® Software (49). Unlike PCA, O-PLS-DA was supervised and did only concern a part of the lipid profile. O-PLS-DA made it possible to create a prediction model associating several features. Ions with low variable importance in the projection (VIP) were repeatedly excluded until there was maximum improvement of the quality of the models. All VIP have been presented in Supplementary Table 3. Model quality was evaluated with cross-validated residuals ANOVA (CV-ANOVA) and cross-validation by Q² (goodness of prediction). The univariate analysis of lipid levels between groups was based on nonparametric Wilcoxon tests with false discovery rate (FDR) correction and a fold-change > 1.5 or < than 0.66, using Metaboanalyst, version 4.0. (<https://www.metaboanalyst.ca/>). All significantly different lipids are presented in Supplementary Table 2. For each comparison, the embryos frozen with EG-S or GLY-TRE (green column) and embryos from Holstein heifers or Holstein lactating cows (blue column), the p-value, the average peak intensity and the fold-change are presented. Univariate analysis is represented by a volcano plot combining the p-value and the fold-change of the t-tests. The y-axis represents the p-value that corresponds to the t-test comparing the differences between the variables (negative base 10 logarithmic scale) and the x-axis represents the fold- change between the subject groups (base 2 logarithmic scale).

Results

Embryo production data

40 Sessions of OPU-IVF (ovum pick up, followed by *in vitro* fertilisation) were performed to produce the embryos needed for the different comparisons. These procedures allowed the production of 64, 49 and 64 grade-1 expanded blastocysts, from respectively, 201, 161 and 177 COCs from n-3 cows, n-6 cows, and heifers (Table 1). The average number of *in vitro*-produced Q1 expanded blastocysts was respectively 3.8 ± 0.4 , 3.3 ± 0.3 and 3.2 ± 0.4 per OPU session (Table 1).

Table 1. Embryo production per OPU-IVF sessions, for n-3 and n-6 cows' group and heifers.

Embryo production data	n-3 cows		n-6 cows		Heifers	
	mean \pm SEM per session	Total	Mean \pm SEM per session	Total	Mean \pm SEM per session	Total
Nb punctured follicles	32.9 ± 2.8^a	559	33.7 ± 3.3^a	505	15.6 ± 1.9^b	312
Nb recovered COC	11.8 ± 1.5	201	10.7 ± 1.3	161	8.9 ± 0.9	177
Nb oocytes in IVM	10.1 ± 1.4	172	8.8 ± 1.2	132	8.0 ± 0.8	159
Nb cleaved embryos	8.1 ± 1.3	138	7.5 ± 1.0	112	7.4 ± 0.8	147
Nb D6 M + BL	5.3 ± 0.9	90	3.6 ± 0.6	54	4.9 ± 0.7	98
Nb D7 blastocyst	4.9 ± 0.6	84	4.1 ± 0.4	62	4.9 ± 0.6	98
Nb D7 expanded blastocysts Q1	3.8 ± 0.4	64	3.3 ± 0.3	49	3.2 ± 0.4	64
Nb D7 expanded blastocysts Q2	$0.8 \pm 0.2^{a,b}$	13	0.3 ± 0.2^b	5	1.0 ± 0.2^a	20
Cleaved embryos (%)	80.2 ± 4.4^b		84.8 ± 5.4^b		92.5 ± 2.1^a	
D6 M + BL (%)	52.3 ± 5.3^a		40.9 ± 7.4^b		61.6 ± 0.9^a	
D7 BL (%)	48.8 ± 5.4^b		47.0 ± 5.1^b		61.6 ± 4.7^a	
D7 BL Q1 (%)	37.2 ± 3.2		37.1 ± 5.9		40.3 ± 0.05	
D7 BL Q2 (%)	$7.6 \pm 3.4^{a,b}$		3.8 ± 1.7^b		12.6 ± 0.02^a	

OPU-IVF: Ovum-pick-up followed with *in vitro* fertilisation, Nb: number; COC: oocyte cumulus complex; M: morula; BL: blastocyst; D6 and D7: day 6 and 7 of development. Q1 and Q2: embryo quality based on International Embryo Technology Society recommendations. Wilcoxon tests were performed between the number of developed embryos of the different comparisons and Khi2 test were realised between development rates of the different comparisons, Superscript a, b, c were used to highlight significant differences.

Lipid composition of bovine embryos

Ninety-seven individual Q1 expanded blastocysts were produced by OPU-IVF and among them, 56 were produced from lactating cows supplemented with either n-6 (n = 27) or n-3 PUFA (n = 29) and 41 were

produced from heifers, including 19 expanded blastocysts frozen according to a GLY-TRE protocol and 22 according to an EG-S protocol (Fig. 1.). LC-HRMS spectra were obtained for these 97 individual Q1 expanded blastocysts using ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC) and 1,686 features were identified. After visual inspection of the data, elimination of ions with coefficient of variation (CV) > 30% in QC and isotope elimination, 515 features were conserved. Among those 515 features, 127 were annotated using the SimLipid Database and LIPID MAP. Among the 127 annotated lipids, 105 have only one annotation proposal. Among them, a majority of glycerophospholipids (glycerophosphocholine, ethanolamine, glycerol, serine, inositol) have been annotated 23/105, sterols 15/105, fatty acids 11/105 and ceramides 11/105 (Supplementary Table 2).

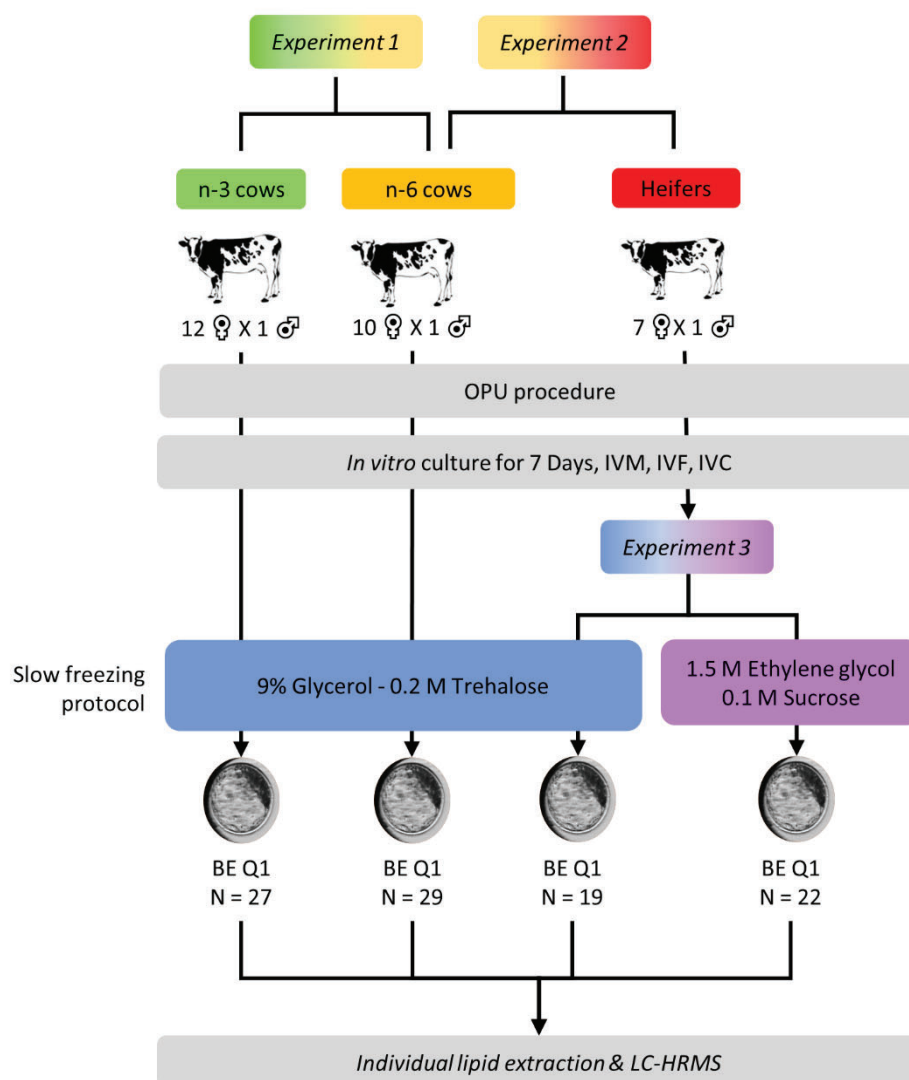


Fig. 1. Experimental design. *In vitro* grade 1 expanded blastocysts from Holstein lactating cows supplemented with n-6 or n-3 PUFA, in their diet, were produced by ovum pick-up followed by *in vitro* fertilisation (OPU-IVF) and were frozen by a glycerol-trehalose protocol after 7 days of development.

Seven Holstein heifers enabled the production of *in vitro* embryos by OPU-IVF. After 7 days of development, all grade 1 expanded blastocysts were frozen: 19 were frozen by a glycerol–trehalose protocol and 22 by an ethylene glycol–sucrose protocol. All embryos underwent lipid extraction. Lipid extracts were analysed by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), which allowed the detection of 515 features.

Mass spectrometry lipid signature of *in vitro*-produced embryos from donor cows supplemented with either n-3 or n-6 PUFA.

To evaluate the effects of n-3 or n-6 PUFA dietary supplementation on embryo lipid profiles, 56 individual expanded blastocysts were used, including 27 embryos produced from oocytes collected from cows supplemented with n-6 PUFA in their diet and 29 n-3 embryos from cows supplemented with n-3 PUFA in their diet (Fig. 1). The PCA showed no discrimination between n-6 and n-3 embryos (Supplementary Fig. 3A). No significant difference in the average of peak intensities' sums was highlighted between n-3 and n-6 embryos, respectively, $2.0E+09 \pm 1.2+08$ vs. $1.41E+09 \pm 1.00+08$, $p = 0.28$. The O-PLS-DA showed a discrimination between the two distinct profiles of n-6 (yellow dots) and n-3 (green dots) embryos, with a cross-validated predictive ability (Q²) of 0.64 and with good reliability of this model evaluated by CV-ANOVA ($p < 0.0001$) (Supplementary Fig. 3B). The fitted model included 69/515 features, meaning that the association of these 69 features participated in explaining the differences between the n-6 and n-3 embryonic lipid profile (Supplementary Table 2).

Among these 69 features, 22 could be annotated. There were 12 overabundant lipids in n-6 embryos: two ceramides, Cer(39:0;O4) and Cer(41:1;O4); a diacylglycerol, DG(38:3); an eicosanoid, FA(22:3;O3); a fatty amide, NAT(18:2); three fatty esters, FAHFA(25:1;O), FAHFA(26:1;O) and CAR(22:0); a glycerophosphoethanolamine, LPE(O-19:0;O); and three triacylglycerols, TG(52:1), TG(52:3) and TG(54:6). There were 10 overabundant lipids in n-3 embryos: an eicosanoid, FA(20:2;O3); two fatty acids, FA(22:0;O) and FA(18:8;O2); a fatty alcohol, FOH(22:12); two fatty amides, NA(22:2) and NA(22:2;O2); a glycerophosphate, PA(32:1); a glycerophosphocholine, LPC(O-14:0); a glycerophosphoethanolamine, LPE(22:4); and an oxidised glycerophospholipid, PS(26:3;O2). However, the univariate analysis did not show any difference between n-6 and n-3 embryonic lipid profiles (Supplementary Fig. 3C).

Mass spectrometry lipid signature of *in vitro*-produced embryos from lactating cows or heifers

To evaluate the impact of physiological stage on embryo lipid profiles, 46 individual expanded blastocysts were used, including 27 from Holstein lactating cows and 19 from Holstein heifers (Fig. 1). The PCA showed a discrimination between *in vitro*-produced embryos from Holstein lactating cows (turquoise dots) or Holstein heifers (red dots) (Fig. 2A). The semi quantitative analysis highlighted that the average of peak intensities' sums of embryos from cows was higher than that of heifers, $1.8E+09 \pm$

1.0+08 vs $1.4E+09 \pm 7.5+07$, respectively, $p = 0.004$. The O-PLS-DA showed a clear discrimination of the two distinct between the two distinct profiles of embryos from Holstein lactating cows (turquoise dots) and Holstein heifers (red dots), with a cross-validated predictive ability (Q^2) of 0.93 and with good reliability of this model evaluated by CV-ANOVA ($p < 0.0001$) (Fig. 2B). The fitted model included 449 features, meaning that the majority of the detected features (449/515) participated in explaining the lipid profile of embryos from Holstein lactating cows or Holstein heifers (Supplementary Table 2). The univariate analysis highlighted 246 significantly different features between embryos from Holstein lactating cows and Holstein heifers ($p < 0.05$ and fold-change < 0.66 or > 1.5), including 120 annotated lipids (Supplementary Table 2). Among the 246 significant features, 210 had a fold-change > 1.5 , including 68 with a fold-change > 10 , indicating an increased abundance in embryos from Holstein lactating cows. Furthermore, 41 features exhibited a fold-change < 0.66 , indicating a decreased abundance in embryos from Holstein lactating cows (Table 2). The volcano plot, based on both the fold-change and the p value, highlighted a lipid enrichment of embryos from Holstein lactating cows, particularly in fatty acids, sterols, fatty amides, oxidised glycerophospholipids and glycerophospholipids like LPC(O-16:1), LPC(18:2), LPC(O-18:1), PC(O-36:4) and others, while embryos from Holstein heifers seemed to be enriched in ceramides (9/41) (Fig. 2C, Fig. 3 and Supplementary Fig. 2).

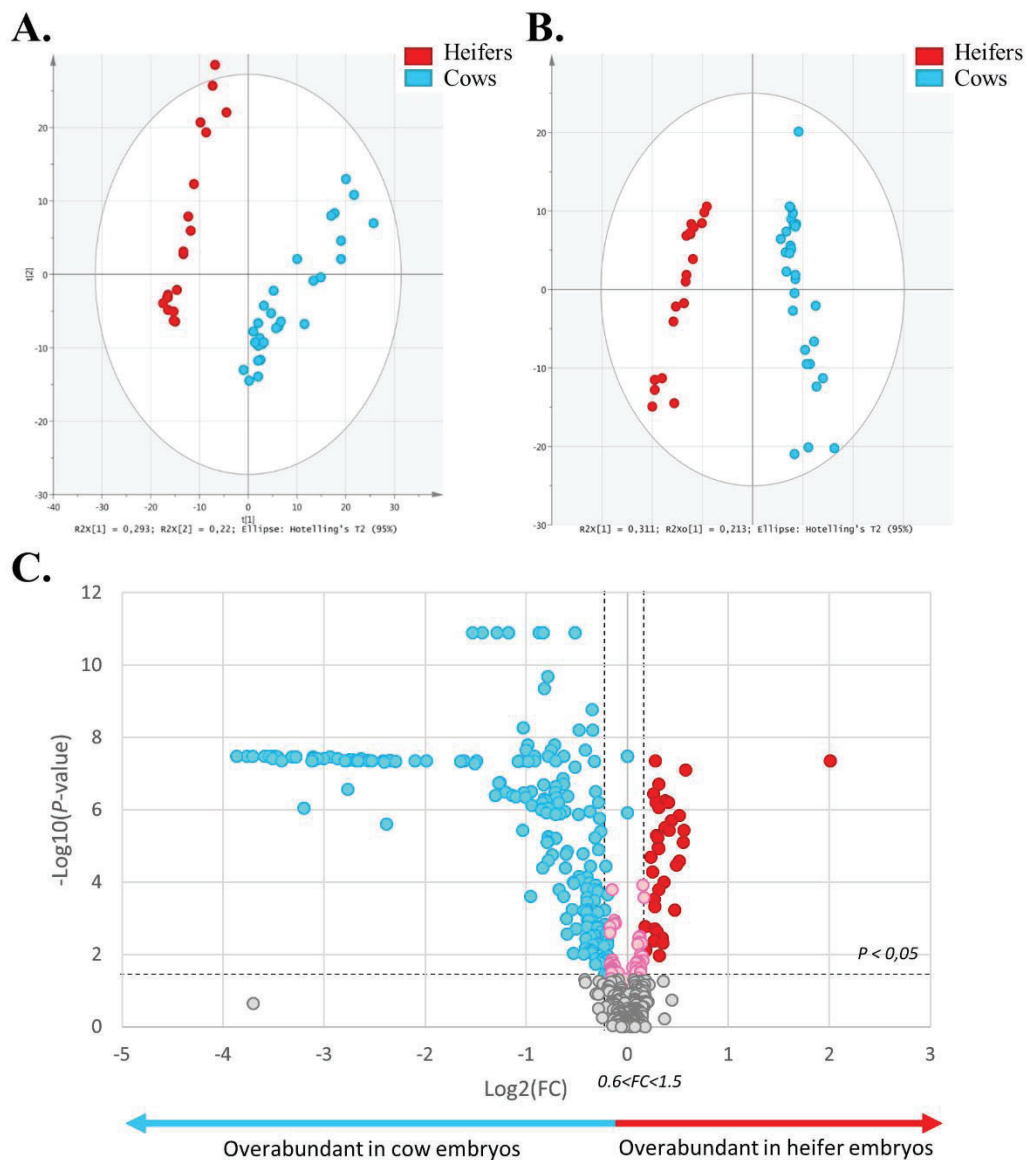


Fig. 2. **A.** Principal component analysis (PCA) plot representing variance among *in vitro*-produced embryos from Holstein lactating cows (turquoise dots) or from Holstein heifers (red dots). **B.** Multivariate analysis by orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA), discriminating the embryo origin according to the embryonic lipid profile. **C.** The univariate analysis via volcano plot, based on fold-change and p-value, highlighted several lipids. Pink dots correspond to lipids with significant p values but a fold-change between 0.66 and 1.5. Turquoise dots correspond to significantly overabundant lipids in embryos from Holstein lactating cows, while red dots corresponding to significantly overabundant lipids in embryos from Holstein heifers. Statistical significance was determined at $p < 0.05$ with a fold-change > 1.5 or < 0.66 .

Table 2. The 30 most differentially expressed lipids between *in vitro*-produced embryos from Holstein lactating cows or Holstein heifers

Observed m/z	Lipid annotation	FDR p.adjusted	mean cow	mean heifer	fc cow/heifer	Observed m/z	Lipid annotation	FDR p.adjusted	mean cow	mean heifer	fc cow/heifer
453,1693	Cisolic acid	1.21E-06	2.12E-04	0	absence	614,5740	Cer(37:0;O4)	4.67E-08	9.67E-04	4.56E-04	9760.85
456,2654	N-arachidonoyl glutamic acid	3.32E-08	8.05E-05	0	absence	550,0878	ND	4.46E-10	5.97E-05	8.99E-06	20143.79
473,1976	3,12-diketo-4,6-petromyzonen e-24-sulfate	3.32E-08	1.08E-04	0	absence	663,4549	ND	3.19E-07	1.53E-02	7.44E-03	23337.99
484,2966	PS(O-16:0/0:0)	3.32E-08	6.84E-05	0	absence	343,1745	FA(22:10)	1.74E-09	9.20E-05	4.16E-05	23911.35
503,3276	ST(28:1;O6)	3.32E-08	9.38E-05	0	absence	663,5346	PA(O-34:0)	6.28E-09	6.22E-04	2.06E-04	32875.75
520,3176	ND	3.32E-08	5.85E-05	0	absence	663,5346	SM(d18:0/13:0)	6.28E-09	6.22E-04	2.06E-04	32875.75
524,2362	PC(8:2(2E,4E)/8:2(2E,4E))	3.32E-08	6.35E-05	0	absence	619,5292	DG(36:3)	6.28E-09	1.27E-03	5.76E-04	91724.00
527,2330	20-acetoxy-clavulone	3.32E-08	6.74E-05	0	absence	512,4175	ND	2.12E-10	1.73E-04	2.82E-05	133266.29
527,2330	PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/0:0)	3.32E-08	6.74E-05	0	absence	653,2921	ND	1.27E-11	6.68E-05	3.43E-06	268974.66
573,2287	ND	3.32E-08	5.92E-05	0	absence	465,1098	ND	1.27E-11	8.29E-05	5.50E-06	431076.12
575,1658	ND	3.32E-08	5.21E-05	0	absence	618,0758	ND	1.27E-11	4.62E-05	6.79E-06	532413.27
596,2369	ND	3.32E-08	1.45E-04	0	absence	324,2032	ND	1.27E-11	1.92E-04	7.03E-06	551746.06
602,1848	ND	3.32E-08	6.03E-05	0	absence	523,2477	ND	1.27E-11	3.07E-04	9.00E-06	705690.02
630,2169	ND	3.32E-08	6.87E-05	0	absence	551,2147	ND	1.27E-11	1.80E-04	2.42E-05	1899426.58
312,2392	ND	3.45E-02	6.99E-05	4.19E-05	0.077	647,5607	DG(38:3)	1.27E-11	1.27E-03	3.84E-04	3008832.56

In this table, only the 30 most significantly different lipids among the 246 differentially expressed lipids between lactating cow and heifer embryos with a fold-change (FC) > 1.5 or < 0.66 are presented. The p values with the false discovery rate (FDR) are presented here. Supplementary Table 2 provides a complete list of all the significant features and lipid annotations

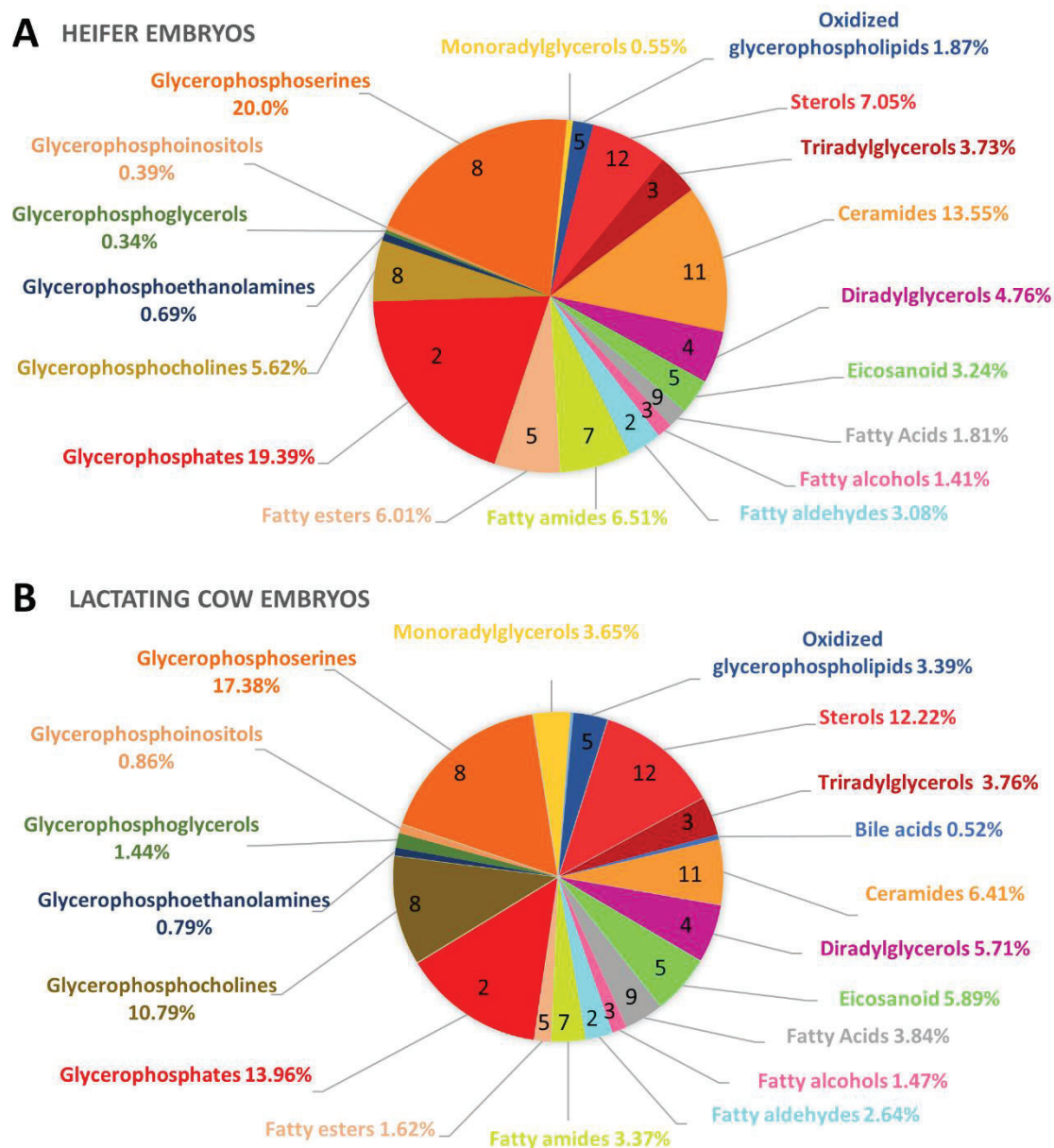


Fig. 3. Graphic representation of lipid profile of *in vitro*-produced embryos from **A.** Holstein heifers or **B.** Holstein lactating cows. The mean intensity of differential peaks (n=246) belonging to each lipid class was represented (%). Not determined and not attributable (ND and NA, respectively) features accounted for 79% and 76% of the lipid profile of, lactating cows and heifers, respectively, and therefore have been removed to streamline the data presentation. The number of features participating in the composition of each class is noted on the pie chart; it varied between 2 and 12.

Mass spectrometry lipid signature of *in vitro*-produced embryos frozen either with glycerol-trehalose or ethylene glycol-sucrose protocol

To evaluate the effects of slow freezing protocols on embryo lipid profiles, 41 individual expanded blastocysts were used, including 19 frozen with GLY-TRE and 22 with EG-S protocol (Fig. 1). The PCA

mostly discriminated embryos frozen with EG-S protocol (blue dots) and GLY-TRE (purple dots) embryos despite the overlap of 5 embryos (Fig. 4A). No significant difference in the average of peak intensities' sums was highlighted between EG-S and GLY-TRE embryos, $2.3E+09 \pm 7.8+08$ vs. $1.4E+09 \pm 8.1+07$, respectively, $p = 0.37$. The O-PLS-DA showed a clearer discrimination of the two distinct groups of embryos, either frozen with the EG-S protocol (blue dots) or with the GLY-TRE (purple dots) protocol, with a cross-validated predictive ability (Q₂) of 0.86 and with good reliability of this model evaluated by CV-ANOVA ($p < 0.0001$) (Fig. 4B). The fitted model included 89/515 features, meaning that the association of these 89 features participated in explaining the lipid profile differences between embryos frozen with the EG-S and GLY-TRE (purple dots) protocols (Supplementary Table 2). The univariate analysis, represented by the volcano plot and based on both the fold-change and the p value, highlighted 105 significantly different features between the embryos frozen with the EG-S or GLY-TRE protocol ($p < 0.05$ and fold-change < 0.66 or > 1.5), including 53 annotated lipids (Supplementary Table 2). Among the 105 significant features, 47 were highlighted by the O-PLS-DA and 72 had a fold-change > 1.5 , indicating an increased abundance in embryos frozen with the EG-S protocol, and 33 features exhibited a fold-change < 0.66 , indicating a decreased abundance of embryos frozen with the EG-S protocol (Table 3). The volcano plot highlighted a lipid enrichment of embryos frozen with the EG-S protocol, particularly in free fatty acids, FA(21:4;O6), FA(22:0;O), FA(18:1;O), FA(18:3) and tricosanedioic acid; in glycerophospholipids, PI(40:3), PI(15:1), PC(O-36:4), PS(O-30:0), PG(16:0/0:0) and PC(16:4); in oxidised glycerophospholipids like PS-PA and OHOOA-PS; and in sterols, 19-oxodesacetylcinobufagin, asparacemosone C and 5 β -hydroxybufotalin. On the contrary, embryos frozen with the GLY-TRE protocol were enriched in PE(30:3) and in sterols ST(27:0;O7), theonellasterol and norcholestanol (Fig. 4C and Supplementary Fig. 1). As highlighted in Fig. 5A and B, a quarter of the lipids could not be annotated because of either a lack of correspondence (ND) or because of too many possibilities corresponding to their mass (NA). The embryos frozen with the EG-S protocol exhibited an enrichment in glycerophosphates (27.4% of the differentially expressed lipids) of the embryonic lipid profile compared with the embryos frozen with the GLY-TRE protocol (Fig. 5 and Supplementary Fig. 1).

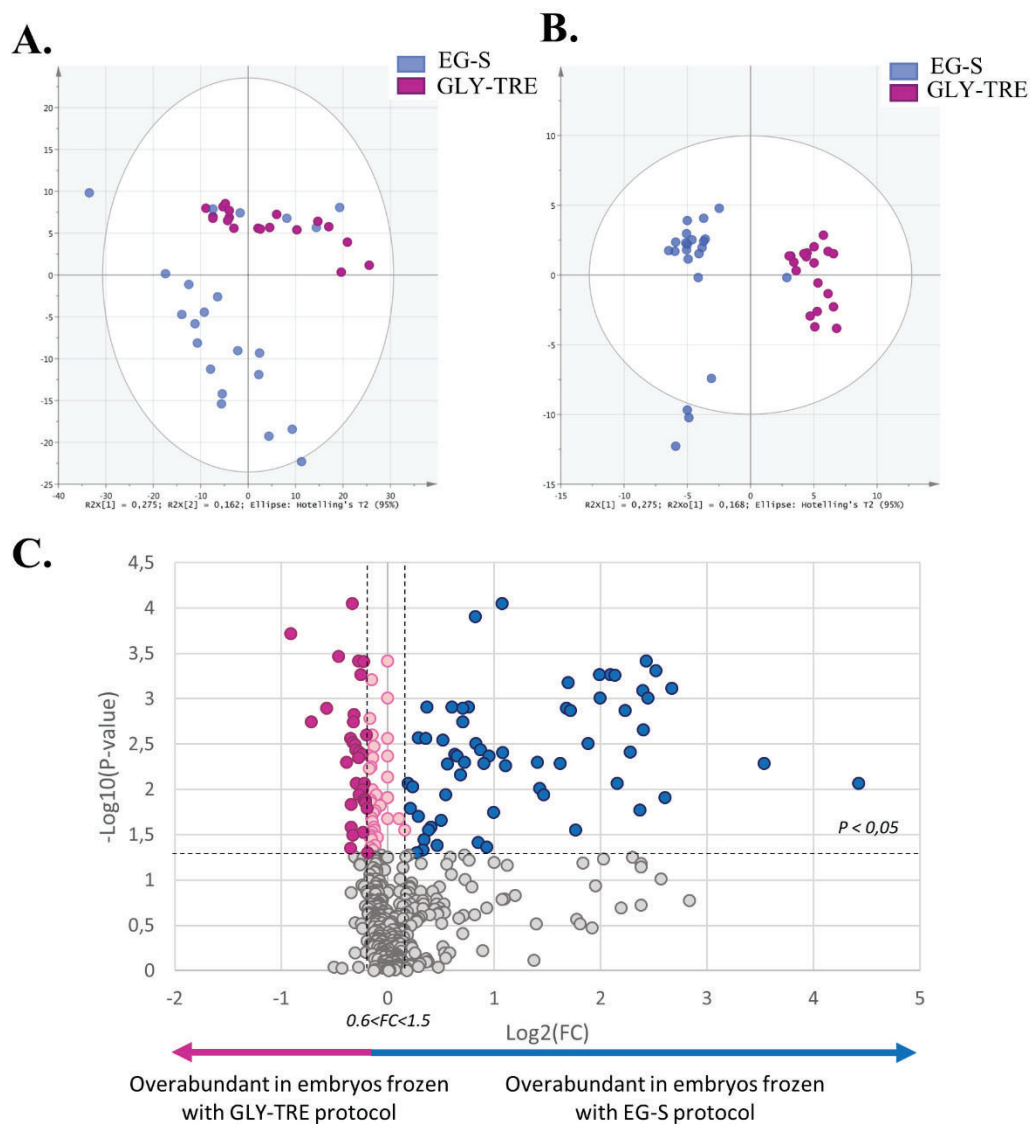


Fig. 4. A. Principal component analysis (PCA) plot representing variance among *in vitro*-produced embryos frozen either with the glycerol-trehalose (GLY-TRE) or the ethylene glycol-sucrose (EG-S) protocol. The blue dots show data for embryos frozen with the EG-S protocol and the purple dots show data for embryos frozen with the GLY-TRE protocol. **B.** Multivariate analysis by orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA), discriminating these two protocols according to the embryonic lipid profile. **C.** Univariate analysis via volcano plot based on the fold-change and the p value. Pink dots correspond to lipids with significant p values but a fold-change between 0.66 and 1.5. Blue dots correspond to significantly overabundant lipids in embryos frozen with the EG-S protocol, while purple dots correspond to significantly overabundant lipids in embryos frozen with the GLY-TRE protocol. Statistical significance was determined at $p < 0.05$ and fold-change > 1.5 or < 0.66 .

Table 3. The 30 most differentially expressed lipids between *in vitro*-produced embryos frozen either with ethylene glycol-sucrose (EG-S) or with glycerol-trehalose (GLY-TRE) protocol.

Observed m/z	Lipid annotation	FDR p.adjusted	mean EG-S	mean GLY-TRE	FD EG-S/ GLY-TRE	Observed m/z	Lipid annotation	FDR p.adjusted	mean EG-S	mean GLY-TRE	FD EG-S/ GLY-TRE
456.2654	N-arachidonoyl glutamic acid	1.23E-02	2.72E-07	0.00E+00	absence	331.2856	MG(16:0)	5.43E-04	1.09E-04	8.90E-07	123.04
503.3276	ST(28:1;06)	1.23E-02	5.39E-07	0.00E+00	absence	568.2056		5.54E-04	2.82E-06	2.09E-08	135.11
520.3176		2.07E-02	4.65E-07	0.00E+00	absence	397.2732	LPA(O-16:0/0:0)	8.56E-03	6.76E-05	4.76E-07	142.23
524.2362	PC(16:4)	4.31E-03	6.72E-07	0.00E+00	absence	500.2167		1.35E-03	3.74E-05	2.19E-07	170.27
527.2330	20-acetoxy-clavulone	2.74E-03	1.15E-06	0.00E+00	absence	415.2132	19-oxododesacylcin obufagin	3.86E-03	7.20E-05	3.78E-07	190.42
527.2330	PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/0:0)	2.74E-03	1.15E-06	0.00E+00	absence	315.3270	FOH(20:0;0)	1.69E-02	5.50E-05	2.36E-07	233.29
573.2287		7.37E-03	3.19E-07	0.00E+00	absence	768.5816	PC(O-36:4)	8.13E-04	5.08E-05	2.04E-07	249.33
596.2369		3.82E-04	1.25E-05	0.00E+00	absence	511.2575	PS-PA	2.21E-03	9.90E-05	3.96E-07	250.15
602.1848		9.76E-04	1.71E-06	0.00E+00	absence	421.2552		3.82E-04	7.75E-06	2.89E-08	268.06
630.2169		3.82E-04	5.62E-06	0.00E+00	absence	359.3170	MG(18:0)	9.76E-04	1.70E-04	6.11E-07	278.95
368.3903	15 ou 17-tetracosenal	1.93E-04	4.47E-05	3.64E-04	0.12	432.2287	19-oxododesacylcin obufagin	4.92E-04	4.02E-05	1.22E-07	330.12
516.4264		1.80E-03	7.23E-05	3.79E-04	0.19	310.2389	FA(18:4;0)	1.23E-02	5.33E-05	1.32E-07	403.66
261.1316		1.27E-03	2.90E-04	1.08E-03	0.27	310.2389	Panaquinquecol ₁	1.23E-02	5.33E-05	1.32E-07	403.66
506.4218	O-behenylcarnitine	3.41E-04	2.97E-04	8.57E-04	0.35	483.2262	5beta-hydroxybufotalin	7.69E-04	5.65E-05	1.22E-07	462.72
256.1761		5.00E-03	1.96E-03	4.75E-03	0.41	485.3603		5.18E-03	1.52E-04	4.47E-08	3412.50

In this table, only the 30 most significantly different lipids among the 105 differentially expressed lipids with a fold-change (FC) > 1.5 or < 0.66 are presented. The p values with the false discovery rate (FDR) are presented here. **Supplementary Table 2** provides a complete list with all the significant features and lipid annotations

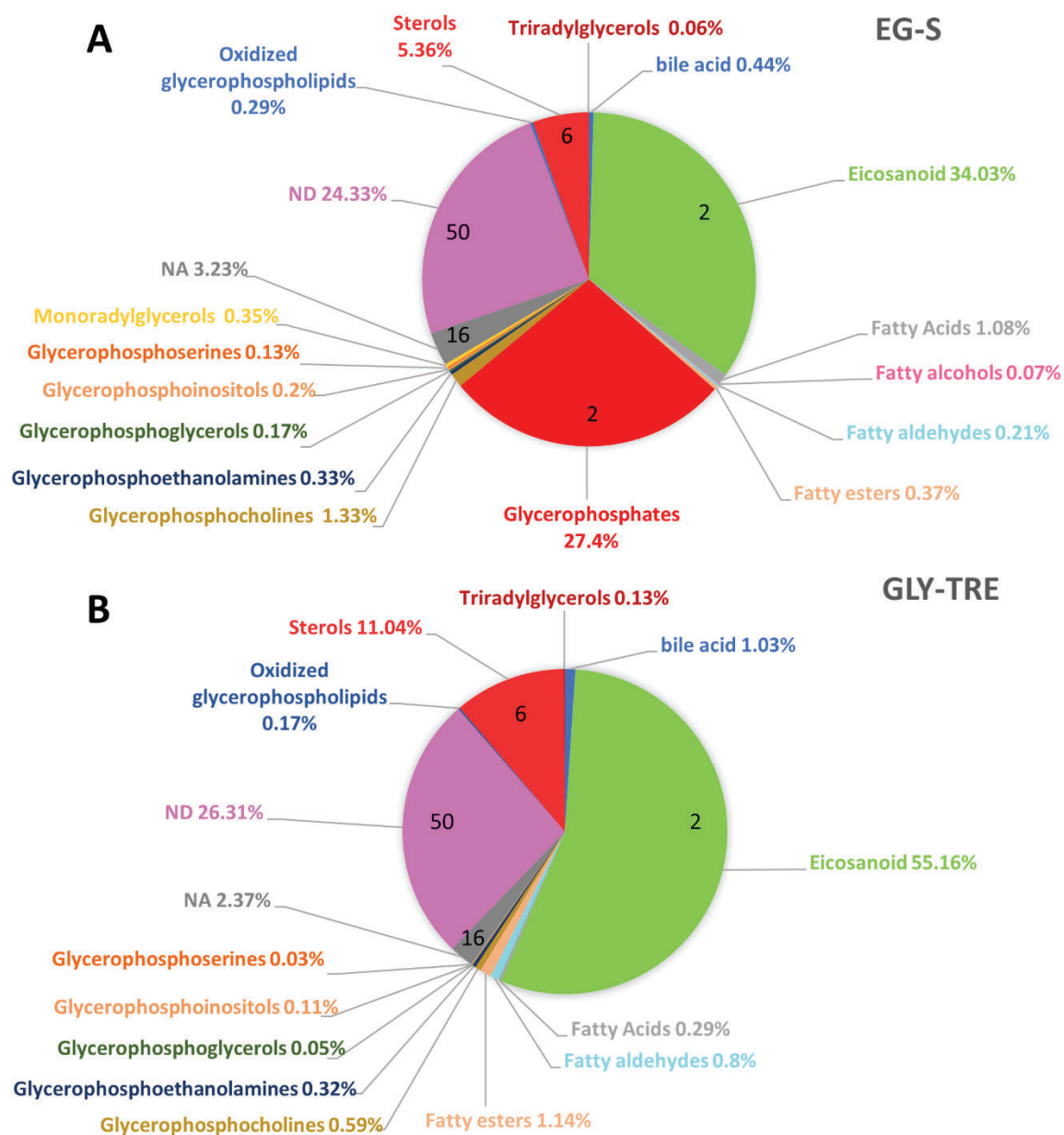


Fig. 5. Graphic representation of the lipid profile of *in vitro*-produced embryos slow frozen with either **A.** the ethylene glycol–sucrose (EG-S) protocol or **B.** the glycerol–trehalose (GLY-TRE) protocol. The mean intensity of the differential peaks (n=105) belonging to each lipid class is represented (%). ND correspond to ‘not determined’, when there was no proposition for the corresponding mass, and NA corresponds to ‘not attributable’, when there were too many lipid propositions for the corresponding mass. The number of features participating in the composition of each class is noted on the pie chart; it varied between 2 and 50.

Discussion

The present work is the first attempt, to our knowledge, to modulate the lipid profile through a modification in the slow freezing protocol, supplementation of the donor's diet or the donor's physiological stage. To evaluate the effects of these changes on the lipid composition of *in vitro*-produced embryos, several comparisons were made: two slow freezing protocols, two donor diets, supplemented with either n-6 or n-3 PUFA, and *in vitro*-produced embryos from heifers and lactating cows. Our result suggested that the embryonic lipid profile is mainly impacted by the physiological stage of the donor, followed by the slow freezing protocol and only mildly affected by the diet of the donors.

The lipid profile of *in vitro*-produced embryos was greatly affected when we compared *in vitro*-produced embryos from Holstein lactating cows and Holstein heifers. Our result demonstrated that most of the lipids constituting the profile contributed to explain the differences between the two groups (449/515 feature constituting the O-PLS-DA models), and more than half of them (246 features) were differentially abundant between lactating cows and heifers, including 85% of overabundant features in the embryonic lipid profiles from Holstein lactating cows. This huge difference can be partly attributable to the physiological stage of the animals. It is known that lactation induces distinct changes in the metabolic status of post-partum lactating cows especially in amino acid and lipid composition of the follicular fluid (50). Of note, non-lactating cows and heifers had similar follicular fluid FA and amino acid composition, reflecting the similarity in their metabolic profile (50). It is known that embryo quality is also affected by the physiological stage of the animal. Indeed, Leroy et al. (34), demonstrated that only 13.1% of lactating Holstein cows embryos were categorised as excellent compared with 62.5% of the non-lactating Holstein heifers embryos. The biggest difference was that 22% of the lactating cow embryos were darker compared with the others, while none of those from heifers had a dark inclusion. It is known that dark inclusion were associated with lipid accumulation in embryonic morphology evaluation (51,52), and the dark embryos contain significantly more lipids in lipid droplets compared to pale embryos (53). *In vivo* produced embryos are also more likely to develop to the blastocyst stage when they are from heifers (23.2%) than from lactating cows (4.0%) (34). Therefore, the lipid profile of embryos from heifers, allowing the production of embryos more capable to develop and thus favourable for gestation, could be considered optimum. Nowadays embryos are indeed in majority produced from heifers in a genetic improvement consideration and more anecdotally on cows. Of note, embryos produced from Holstein lactating cows were produced 4 years before the heifer embryos and did not follow the exact same diet due to their different needs. We can't rule out that confounding factors such as feeding management or environmental factors could induce biases. The Holstein lactating cow

embryos, which were produced before the Holstein heifer embryos, showed an overabundance of lipids that were therefore not degraded because of a longer storage duration, allowing the comparison. In addition, experimental conditions (protocols, laboratory, incubators) remained unchanged between the two-production periods. Moreover, as discussed below, it would seem that the impact of the diet is smoothed out by the *in vitro* culture; hence, we can hypothesize that the impact of the lipid profile was mainly due to the physiological stage of the animals and to a lesser extent to the environment production of the embryos. In fact, if this smoothing effect couldn't be evaluated in that study, we suggest that the differences are high enough between lactating cow and nulliparous heifer oocytes to remain at the end of embryonic culture. As we cannot demonstrate that the observed effect is only due to the physiological status, this effect rather be referred to a physiological/year of production effect.

The embryonic lipid profile is also greatly modulated by the slow freezing protocol, meaning that the choice of the slow freezing media and/or kinetics strongly modifies the embryonic lipid composition (Fig. 5). As demonstrated here, a large part of significantly different features had an EG-S/GLY-TRE fold-change >1.5 (70/105) indicating an enrichment of lipids in the *in vitro*-produced embryos frozen with EG-S protocol. They were especially enriched in glycerophospholipids, oxidized glycerophospholipids, and FA. On the other hand, *in vitro*-produced embryos frozen with GLY-TRE protocol contain fewer lipids that were mainly not identified, but they contained glycerophospholipids and sterols. As the embryos were produced similarly from the same seven Holstein heifers, we can therefore suppose that this variation comes from the freezing protocols, either by preserving the lipids from degradation or by providing them via the composition of the medium. The lipid profile of EG-S embryos was notably enriched in a single glycerophosphate, the diacylglycerophosphate PA(32:1), which was present in large quantities in EG-S embryos (2.16×10^{-2} i.e. 27.3% of the significant lipids). Due to its abundance, one can speculate that it comes from a huge degradation occurring in GLY-TRE protocol, or it could come from the freezing medium that could provide it or its precursors. Diacylglycerophosphate is a derivative of 1-acylglycerophosphate, which itself is a derivative of phosphatidic acid, known to be a common intermediate for the synthesis of triacylglycerol and glycerophospholipids (54). We previously showed that the quantity of PA(32:1) was 6-fold higher in fresh *in vivo*-produced embryos compared with frozen ones, using EG-S protocol (3). It would therefore seem that, despite not being sufficient to prevent the degradation of PA(32:1) compared to fresh embryos, the EG-S protocol could be more suitable for the freezing of expanded bovine expanded blastocysts.

In the eukaryotic membrane, phospholipids are the most abundant lipids. Indeed, PI, PC, PE, and PG are structural units of the membrane (55), and their concentration determines most of the physicochemical cell membrane properties, like fluidity, permeability, and thermal phase behaviour

(56). Therefore, we can speculate that the EG-S protocol is less harmful for glycerophospholipids than the GLY-TRE protocol (Supplementary Fig. 1). Interestingly, whether the freezing media contained ethylene glycol or glycerol does not affect pregnancy rates. In fact, after direct transfer of frozen-thawed bovine embryos, pregnancy rates were not different between control group (69%) consisting of embryos frozen in 1.8 M ethylene glycol and embryos frozen with either 1.8 M ethylene glycol + 0.25 M sucrose (52%), or 1.4 M glycerol + 0.25 M sucrose (60%) after being equilibrated for 10 to 20 min in freezing solution (57).

Most of the recovery, holding and cryopreservation media of bovine embryos are commercially available and commonly contains animal derived products, such as FCS or bovine serum albumin (BSA) (58–61).

Although the mechanisms through which serum affects embryos have not yet been fully described, serum is known to cause lipid accumulation in embryos (6,62), compromising their ability to metabolise lipids properly. This dysfunction is strongly correlated with apoptosis and cryo-susceptibility (7,52,63,64). In our experiments the GLY-TRE freezing media contained BSA and 20% of FCS while the EG-S protocol contained only BSA. FCS or BSA have surfactant properties, which reduce the surface tension in the medium, preventing embryos from sticking to plastic surfaces or floating at the surface thus facilitating their handling (59,65,66). BSA can also be used for its antioxidant and chelator effects in embryo media, especially those made with water or containing salts that could possibly be contaminated by heavy metals (59). The addition of serum or BSA seems to protect embryos from possible toxic effect of cryoprotectants during the cryopreservation protocol. Despite the advantages of using BSA and FCS in embryo media, their composition is not stable and varies between batches. They contain vitamins, growth factors, amino acids, energy substrate and minerals, and they are known to exhibit a variable ability to support blastocyst development in culture (63,67). The literature does not allow us to conclude whether EG or GLY protocol is more effective since there is no/few pregnancy data available (57) and the studies comparing the EG and GLY protocols do not show any significant difference (68,69) in survival and hatching rates. In addition, no study compares these same two protocols and variations in the use of sugars, in the cryoprotectant concentration and in the temperature curve make comparisons difficult. Therefore, future studies, in particular embryo transfer, are needed to explore the functional consequences of different lipid profiles.

However, in view of our results, EG-S protocol allowed the preservation of glycerophospholipids compared to the GLY-TRE protocol. It might be possible that supplementing GLY-TRE with PA(32:1) leads to a reduction in the differences observed. Only transfer results comparing these two protocols would allow us to know whether this difference in lipid profile has a functional impact beyond the blastocyst stage. Moreover, we cannot discuss our results further regarding the freezing protocol

effects compared with the literature, because the present paper seems to be one of the first to describe the effects of these two freezing protocols on the *in vitro*-produced bovine embryonic lipid profile. However, we hypothesised that the EG-S protocol is more suitable for bovine blastocyst cryopreservation. Further studies should confirm the differences observed in this paper and proceed to embryo transfer so that it could link embryo lipid differences to implantation or pregnancy success and therefore to embryo quality.

The lipid profile of *in vitro*-produced embryos was, in a lesser extent, affected by the donor's diet, particularly the addition of n-6 or n-3 PUFA. As reported in the present paper, despite the absence of differential lipids, the association of 69/515 lipids was able to predict to which group the embryos belonged with 64.4% probability. Researchers have shown that there was a significantly higher COC recovery rate for n-3 PUFA-supplemented cows compared with n-6 PUFA-supplemented cows (38.0% vs. 32.8%, respectively; diet effect $p = 0.0035$). These authors also highlighted an increase in the good-quality blastocyst rate in n-3 PUFA-supplemented cows compared with n-6 PUFA-supplemented cows (42.2% vs. 32.7%, respectively; diet effect $p = 0.0217$) (14). The analysis of the lipid profile of their oocytes indicated that oocytes collected from n-3 PUFA-supplemented donors would be more suitable for obtaining good quality embryos. Oocytes from cows supplemented with n-3 or n-6 PUFA exhibited 110 differentially abundant features, including 42 that were identified: 12 PC, three PE, two SM and one LPC were more abundant in n-3 PUFA oocytes, whereas 15 PC, PE(30:0), SM(34:1), two LPC and two TG were more abundant in n-6 oocytes (14). These results were partly confirmed by our experiments. Indeed, three TG were more abundant in n-6 embryos while, LPC, one LPE and two FA were more abundant in n-3 embryos, finding that suggest a greater level of lipolysis in n-3 embryos (19,70). However, the differences observed in embryonic lipid profiles were milder compared with the differences reported in oocytes, therefore suggesting that the 7-days *in vitro* culture system could smoothed out the lipid profile differences. Our previous work also showed that when embryos are produced *in vitro*, there was a decrease in the difference between fresh and frozen embryos (4/496), while greater differences were observed for embryos produced *in vivo* (35/496)(3), a phenomenon that would seem to be in favour of a smoothing the differences by the *in vitro* culture. We can therefore hypothesize that, as the diet didn't impact the blastocyst lipid profile, there will be no difference in the transfer rate. To confirm this result, it would have been interesting to analyse the lipid profile of *in vivo*-produced embryos. In the same way, dietary rumen protected PUFA rich in LA induced an increase in PCe(38:2), only in vitrified embryo but did not affect the development rate and the re-expansion after devitrification (71). Modification of the diet seem sufficient to modify FA content in the follicular fluid, but *in vitro* supplementation should be considered when embryos are produced by OPU-IVF.

To conclude, we have provided interesting insights on the parameters leading to variations in the

lipid profiles of *in vitro*-produced bovine embryos. The most important finding was that physiological stage as well as the whole freezing protocol strongly impacted the embryonic lipid profile, unlike the addition of n-3 PUFA or n-6 PUFA to the donor diet.

Data availability statement

All data described in the present paper are located within the manuscript and the supplementary data.

Conflict of interest

None of the authors declares any conflict of interest.

Funding

This research was funded by ALLICE and APIS-GENE under the project CRYOPTIM

Author contributions statement

PS, DLB, LS, TJ, SB, and PE conceived the experiment(s), SJI, DLB, OD, LLB and AL conducted the experiment(s), SJI analysed the results. SJI and SE wrote the main manuscript text. SJI, SE, PS, DLB, LS, PE, LLB, OD, AL, SF, TJ, and SB reviewed the manuscript.

References

1. Barceló-Fimbres M, Brink Z, Seidel GE. Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. *Theriogenology*. 2009 Jan 15;71(2):355–68.
2. Moallem U, Shafran A, Zachut M, Dekel I, Portnick Y, Arieli A. Dietary ω -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction*. 2013 Dec;146(6):603–14.
3. Janati Idrissi S, Le Bourhis D, Lefevre A, Emond P, Le Berre L, Desnoës O, et al. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either *in vivo* or *in vitro* before and after slow freezing process. *Sci Rep*. 2021 Jun 2;11(1):11618.
4. Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, et al. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol Reprod*. 2012 Jun;87(6):130.
5. van Wagtenonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, et al. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*. 2000 Jan 15;53(2):575–97.
6. Sudano et al. MJ. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. - PubMed - NCBI [Internet]. 2011 [cited 2019 Jan 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=lipid+content+and+apoptosis+of+in+vitro+produced+bovine+embryos+as+determinants+of+suceptibility>
7. Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*. 1996 Jan 1;45(1):27–40.
8. Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil*. 1999 Jul;116(2):373–8.
9. Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. 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*. *J Reprod Fertil*. 1998 Jan;112(1):123–30.
10. Moallem U. Invited review: Roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2018 Oct;101(10):8641–61.
11. Petit HV, Twagiramungu H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology*. 2006 Sep 15;66(5):1316–24.
12. Dirandeh E, Towhidi A, Zeinoaldini S, Ganjkanlou M, Ansari Pirsaraei Z, Fouladi-Nashta A. Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations during the postpartum periods of early lactating dairy cows on milk yield, metabolic responses, and reproductive performances. *J Anim Sci*. 2013 Feb;91(2):713–21.
13. Mattos R, Staples CR, Arteché A, Wiltbank MC, Diaz FJ, Jenkins TC, et al. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF $_{2\alpha}$, milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. *J Dairy Sci*. 2004 Apr;87(4):921–32.

14. Freret S, Oseikria M, Le Bourhis D, Desmarchais A, Briant E, Desnoes O, et al. Effects of a n-3 PUFA enriched diet on embryo production in dairy cows. *Reproduction*. 2019 Apr 1;
15. Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*. 2012 Mar;142(3):592S-599S.
16. Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. - PubMed - NCBI [Internet]. 2005 [cited 2019 Mar 12]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=the+effect+of+chilling+on+membrane+lipid+phase+transition+in+human+oocytes+and+zygotes>
17. Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2000 Oct 1;15(10):2160–4.
18. Oseikria M, Elis S, Maillard V, Corbin E, Uzbekova S. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. *Theriogenology*. 2016 Jun;85(9):1625-1634.e2.
19. Elis S, Oseikria M, Vitorino Carvalho A, Bertevello PS, Corbin E, Teixeira-Gomes A-P, et al. Docosahexaenoic acid mechanisms of action on the bovine oocyte-cumulus complex. *J Ovarian Res*. 2017 Nov 9;10(1):74.
20. Ferré LB, Kjelland ME, Taiyeb AM, Campos-Chillon F, Ross PJ. Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reprod Domest Anim*. 2020 Jun;55(6):659–76.
21. Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. - PubMed - NCBI [Internet]. 1996 [cited 2020 Mar 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8975686>
22. Pereira RM, Carvalhais I, Pimenta J, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM, et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. *Anim Reprod Sci*. 2008 Jul;106(3–4):322–32.
23. Amstislavsky S, Mokrousova V, Brusentsev E, Okotrub K, Comizzoli P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. *Biopreserv Biobank*. 2019;17(1):76–83.
24. Jung GT, Lee JH, Park D, Ahn JM, Um D-E, Shin H, et al. Lipidomic changes in mouse oocytes vitrified in PEG 8000-supplemented vitrification solutions. *Cryobiology*. 2021 Apr;99:140–8.
25. Boruszewska D, Sinderewicz E, Kowalczyk-Zieba I, Grycmacher K, Woclawek-Potocka I. The effect of lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte, and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015 May 16;13:44.
26. Boruszewska D, Sinderewicz E, Kowalczyk-Zieba I, Grycmacher K, Woclawek-Potocka I. Studies on lysophosphatidic acid action during *in vitro* preimplantation embryo development. *Domest Anim Endocrinol*. 2016 Jan;54:15–29.
27. Eroglu A, Bailey SE, Toner M, Toth TL. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biol Reprod*. 2009 Jan;80(1):70–8.

28. Huang J. High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. - PubMed - NCBI [Internet]. 2007 [cited 2019 Feb 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=High+survival+and+hatching+rates+following+vitrification+of+embryos+at+blastocyst+stage%3A+a+bovine+model+study>.
29. Crowe LM, Crowe JH. Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Dec 22;946(2):193–201.
30. Oliver AE, Hincha DK, Crowe JH. Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002 Mar;131(3):515–25.
31. Zhang M, Oldenhof H, Sieme H, Wolkers WF. Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1858(6):1400–9.
32. Zhang M, Oldenhof H, Sieme H, Wolkers WF. Combining endocytic and freezing-induced trehalose uptake for cryopreservation of mammalian cells. *Biotechnol Prog*. 2017 Jan;33(1):229–35.
33. Oldenhof H, Zhang M, Narten K, Bigalk J, Sydykov B, Wolkers WF, et al. Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging. *Biol Reprod*. 2017 Jan 1;97(6):892–901.
34. Leroy JLMR, Opsomer G, De Vlieghe S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, et al. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*. 2005 Dec;64(9):2022–36.
35. Valour D, Degrelle SA, Ponter AA, Giraud-Delville C, Champion E, Guyader-Joly C, et al. Energy and lipid metabolism gene expression of D18 embryos in dairy cows is related to dam physiological status. *Physiol Genomics*. 2014 Jan 15;46(2):39–56.
36. D’Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology*. 2019 Feb;125:277–84.
37. Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci*. 2001 Jun;84(6):1277–93.
38. Lonergan P, Fair T, Forde N, Rizo D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*. 2016 Jul 1;86(1):270–7.
39. Gutierrez CG, Gong JG, Bramley TA, Webb R. Selection on predicted breeding value for milk production delays ovulation independently of changes in follicular development, milk production and body weight. *Anim Reprod Sci*. 2006 Oct;95(3–4):193–205.
40. Snijders SE, Dillon PG, O’Farrell KJ, Diskin M, Wylie AR, O’Callaghan D, et al. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2001 Jan 31;65(1–2):17–31.
41. Veerkamp RF, Beerda B, van der Lende T. Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livestock Production Science*. 2003 Oct 1;83(2):257–75.
42. Webb R, Garnsworthy PC, Gong J-G, Armstrong DG. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*. 2004;82 E-Suppl:E63-74.

43. Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.* 2002 Nov;85(11):2813–22.
44. Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology.* 1996 Feb;45(3):573–81.
45. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1988 Jun;38(5):1171–80.
46. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb R, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. - PubMed - NCBI [Internet]. 2012 [cited 2020 Mar 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Global+metabolic+profiling+of+animal+and+human+tissues+via+UPLC-MS>
47. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S9-14.
48. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2005 May;46(5):839–61.
49. Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics.* 2003;17(3):166–73.
50. Forde N, O’Gorman A, Whelan H, Duffy P, O’Hara L, Kelly AK, et al. Lactation-induced changes in metabolic status and follicular-fluid metabolomic profile in postpartum dairy cows. *Reprod Fertil Dev.* 2016 Oct;28(12):1882–92.
51. Abe H, Hoshi H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev.* 2003 Jun;49(3):193–202.
52. 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. *Journal of Reproduction and Development.* 1999;45(1):97–103.
53. Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicácio AC, Assumpção MEOA. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology.* 2002 Jan 1;57(1):345–59.
54. Yamashita A, Hayashi Y, Matsumoto N, Nemoto-Sasaki Y, Oka S, Tanikawa T, et al. Glycerophosphate/Acylglycerophosphate Acyltransferases. *Biology.* 2014 Dec;3(4):801–30.
55. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 May;19(5):281–96.
56. Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 May;4(5):414–8.
57. Dochi O. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *J Reprod Dev.* 2019 Jun 13.
58. Bettencourt EMV, Bettencourt CM, Silva JNCE, Ferreira P, de Matos CP, Oliveira E, et al. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved *in vivo* produced ovine embryos. *Theriogenology.* 2009 Apr 1;71(6):947–58.

59. Hasler JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(1):119–25.
60. Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology.* 1999 Mar;38(2):95–105.
61. Zander-Fox D, Lane M, Hamilton H. Slow freezing and vitrification of mouse morula and early blastocysts. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Aug;30(8):1091–8.
62. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *J Reprod Fertil.* 1996 Jan 3;106(2):299–306.
63. Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science.* 2009 Apr 1;121(2):141–9.
64. I.M A, G C, S K, Le Guienne B, Mermillod P, Guyader-Joly C, et al. Difference in lipid composition between *in vivo*-and *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2000 Jan 1;53:346.
65. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003 Jun;46(3):205–29.
66. Witkowski JA, Brighton WD. Influence of serum on attachment of tissue cells to glass surfaces. *Exp Cell Res.* 1972 Jan;70(1):41–8.
67. Sung L-Y, Du F, Xu J, Chang W, Nedambale TL, Zhang J, et al. The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod Nutr Dev.* 2004 Dec;44(6):551–64.
68. Gumber DJ. The Effects of Different Cryopreservation Techniques on the Survival Rate of *In vitro* Produced (IVP) and Biopsied Bovine Blastocysts. 2014;11.
69. Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology.* 1997 Sep;48(4):563–79.
70. Elis S, Desmarchais A, Freret S, Maillard V, Labas V, Cognié J, et al. Effect of a long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet on adipose tissue lipid profiles and gene expression in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 2016 Dec;99(12):10109–27.
71. Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Nogueira É, Cabral EC, Ferreira CR, Eberlin MN, et al. Membrane lipid profile of *in vitro*-produced embryos is affected by vitrification but not by long-term dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids for oocyte donor beef heifers. *Reprod Fertil Dev.* 2017 Jun;29(6):1217–30.

Conclusions et perspectives

Si l'on néglige l'effet de l'année de production, la comparaison des embryons produits à partir des vaches en lactation dont le régime alimentaire a été supplémenté en oméga 6 avec des embryons produits par OPU-FIV sur génisses a permis de mettre en évidence que les embryons issus des vaches en lactation étaient plus riches en lipides, notamment en acide gras, stérols, glycérophospholipides (GP) et GP oxydés que ceux issus des génisses. Plus un embryon est riche en lipides plus le risque de dommages lors de sa cryopréservation est important. Ainsi, les différences observées pourraient en partie expliquer la diminution des taux de cryosurvie des embryons issus des vaches. Néanmoins, il convient de rappeler que les différences observées pourraient être également expliquées par les différences de métabolisme énergétique des animaux (vache en lactation vs. génisse ; systèmes alimentaires différents) ou encore par l'année de production des embryons (évolution des lots de réactifs).

Lorsque des embryons sont produits à partir des mêmes génisses par OPU-FIV et congelés selon deux protocoles de congélation lente différents, des différences de profil lipidique sont mises en évidence. En effet, le protocole contenant de l'éthylène glycol et du sucrose (EG-S) a montré une préservation plus importante des acides gras, des GP et l'apparition d'un glycérophosphate, en comparaison au protocole contenant du glycérol et du tréhalose (GLY-TRE). Il est possible que cette meilleure préservation soit due aux caractéristiques du protocole de cryoconservation lui-même. En effet, en plus d'être composé de cryoprotecteurs différents, les protocoles présentaient des courbes de température différentes. De cette manière les embryons cryoconservés avec le protocole GLY-TRE ont passé bien plus de temps à température ambiante en présence des cryoprotecteurs que ceux cryoconservés avec le protocole EG-S. Congeler des embryons en suivant une seule et même courbe de température pourrait permettre de vérifier si le changement de profil lipidique est dû aux différentes cinétiques de descente en température ou aux cryoprotecteurs. Par la suite, seule la réalisation de transferts d'embryons congelés selon les deux protocoles permettrait de vérifier si le changement de profil lipidique lors du processus de congélation est associé à une variation des taux de gestation et/ou à des différences dans le développement des individus. Toutefois, ce résultat souligne également l'importance d'optimiser les protocoles de cryoconservation.

La modulation du profil lipidique des embryons, des femelles donneuses a révélé que le régime alimentaire des donneuses n'avait pas d'impact sur le profil lipidique des embryons produits alors

que Freret et al. avaient observé des différences marquées au niveau ovocytaire (Freret et al., 2019b). Il semblerait que le protocole de production *in vitro* lisse en partie les différences acquises par l'ovocyte *in vivo*, diminuant ainsi l'intérêt de jouer sur le régime alimentaire des femelles donneuses pour moduler le profil lipidique des embryons produits *in vitro*. Il est important de rappeler que la présence de sérum dans les milieux de production *in vitro* a pu dissimuler une différence de profil lipidique existante et que les résultats observés auraient pu être différents si les embryons avaient été cultivés sans. Ce résultat justifie également l'approche envisagée consistant à apporter des oméga 3 directement dans les milieux de culture utilisés lors du protocole de PIV. Ainsi, l'ajout d'oméga 3 directement dans les milieux de maturation des ovocytes et de culture des embryons a été réalisé sans ajout de sérum. L'objectif étant de vérifier si l'apport d'oméga 3 directement dans les milieux de culture *in vitro* a un impact sur la qualité embryonnaire et influe sur la cryosurvie des embryons. Pour ce faire deux concentrations de l'acide docosahexaénoïque (DHA) ont été testées, dans le milieu de maturation. Le DHA étant obligatoirement dilué dans du DMSO et associé à un antioxydant, c'est l'effet de la combinaison de ces facteurs qui a été analysé. La qualité embryonnaire a été mesurée par l'évaluation des taux de développement, de cryosurvie et l'immunomarquage d'une protéine issue du gène de la pluripotence SOX2. La combinaison donnant les meilleurs résultats a été additionnée au milieu de culture des embryons ou alors sur la totalité du développement dans les milieux de maturation et de culture post fécondation. La qualité embryonnaire a été évaluée de la même manière que précédemment.

5. Article 3. Effect of the combination of DHA and carnosine on the quality of the in vitro produced bovine embryo

Sarah Janati Idrissi ^{1,3*}, Slezec-Frick Victoria ¹, Daniel Le Bourhis ¹, Laurene Le Berre ¹, Thierry Joly ^{2,3}, Samuel Buff ³, Alice Desmarchais ⁴, Laurent Schibler ¹, Pascal Salvetti ¹, Sébastien Elis ^{4*}

1 Alice, 37380 Nouzilly, France;

2 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA-Lyon, UPSP ICE 2021.A104, F-69007 Lyon, France

3 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, VetAgro Sup, UPSP ICE 2021.A104, F-69280 Marcy l'Etoile, France;

4 CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, 37380 Nouzilly, France

* Correspondance: sarah.janati.idrissi@gmail.com

Submitted: 14/02/2022

Journal : *Theriogenology*

Abstract

Docosahexaenoic acid (DHA) is a n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) that improves fertility by increasing membrane fluidity. Moreover, embryos produced by donor females supplied in n-3 PUFA did not show any difference in terms of lipid profile after 7 days of culture. The present study aimed at investigating DHA (20 and 100 μ M) effects during oocyte maturation and embryo development on developmental rates, cryosurvival rates, and number of pluripotent cells. The free fatty acid receptor-4 (FFAR4), which is able to bind DHA, was evidenced by immunostaining. DHA 20 μ M in the *in vitro* development (IVD) medium decreased the percentage of pluripotent SOX2 cells compared to the control (8.4% vs. 10.9%) without affecting the number of total cells (196.7 vs. 191.6 cells), the developmental and cryosurvival rates. Such decrease in pluripotent cells, relevant with the differentiation of the first lineage within the inner cell mass, without any alterations is an improvement of the embryo quality. On the contrary, embryos without any pluripotent SOX2 cells won't be able to achieve gestation. Even though it was not significant, DHA in the IVD medium resulted in an increased percentage of embryos with pluripotent SOX2 cells compared to control (75.3% vs. 63.3%). Future studies should thus confirm these results by carrying out embryo transfers to assess the beneficial effects of DHA supplementation.

Introduction

The ability of oocytes to develop *in vitro* into viable embryos after fertilisation is mainly acquired during final oocyte growth and meiotic maturation [1]. However, while the intrinsic quality of the oocyte is the main factor affecting embryonic development rates, the main factor affecting the quality of blastocysts is the post-fertilisation culture condition [2]. Embryonic development in mammals depend initially on the individualisation of the first cell lineages which is the specification of trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM). The establishment of these primitive tissues is crucial for the future of the new individual [3–6] and their allocation during the early stages of development in cattle is therefore a quality marker [7,8]. The pluripotency of ICM cells is required to enable the proper embryo development. The transcription factors required for the maintenance of pluripotency include POU class 5 homeobox 1 (POU5F1/OCT4) and SRY (sex determining region Y)-box transcription factor 2 (SOX2) [9]. The heterodimerisation of OCT4-SOX2 plays an essential role in the maintenance of pluripotency and therefore in the generation of a viable conceptus [7,10]. However, while OCT4 is reported in ICM and TE cell nuclei up to 9 days of development [11,12], SOX2 is restricted to ICM at the same developmental stage [3,12,13]. Therefore, SOX2 is a more suitable marker of ICM pluripotency in cattle, at the expanded blastocyst stage [11,13].

Freezing process impairs bovine embryos and especially ICM cells [8]. In addition, membrane damage and DNA fragmentation induced by cryopreservation, potentially further reduced embryonic competence [14]. Thus, evaluating the establishment of the post-thawing ICM and TE would be a relevant indication of the quality of bovine embryos without embryo transfer. Post-thawing survival of embryos is strongly correlated with culture systems [15] that could notably modulate embryo lipid composition and consequently compromise cell signalling and function in blastocysts [16].

Nowadays, most of embryo development media are supplemented with foetal calf serum (FCS). However, FCS was associated with the accumulation of lipid droplets in the cytoplasm of ICM and TE cells [17] and with an increase in apoptosis cell rate and with embryo cryosensitivity [2,17]. These effects were associated with decreases in total cell number, ICM cell number and ICM/TE ratio, this ratio being crucial to ensure a proper embryo development and the establishment of a gestation [8,18,19].

Lipid supplementations have been used to increase developmental rates in cattle. Docosahexaenoic acid (DHA) is a n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) with 22 carbon chain (C22:6) [20,21]. DHA supplied in the cow diet led to modification in the lipid composition of bovine oocytes [1]. Both glycerophospholipid, major component of cell membranes, and sphingomyelins, involved in membrane structure stabilisation, were upregulated [22]. Lipid composition of oocytes and embryos affects their development and their cryotolerance [16]. DHA also increased membrane fluidity, its incorporation into the membrane facilitating membrane deformation [23]. Moreover, DHA supplementation in the culture

medium (1 to 20 μ M) lead to an increase in the proliferation and steroidogenesis of granulosa cells [24] and to an increase in oocyte quality *in vitro* [21]. Furthermore, lipids and especially n-3 PUFA being easily oxidised, compensatory antioxidant supplementation has also been assessed *in vitro*. Carnosine supplementation, a reactive oxygen species scavenger, into the *in vitro* development medium induced an accelerated kinetic from the 4-cell stage to compaction of the morula, as well as a higher post-thaw viability [25].

We hypothesized that DHA could improve the success rate of frozen embryo transfer through its an improvement of embryo quality but also through a potential reduction of their cryosensitivity related to DHA incorporation into the membrane. The objective of this study was thus to determine the effect of DHA and carnosine supplementation in IVM and/or IVD media, in the absence of serum, on embryonic quality using both cryosurvival rates and markers of pluripotency (SOX2) of bovine grade-1 expanded blastocyst, after thawing.

Methods

No experiments with living animals were performed. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), unless otherwise stated in the text.

Experimental design

Experiment 1. *Analysis of the expression of a free fatty acid receptor, FFAR4, in COCs, 2-cell stage embryos and expanded blastocysts.*

To confirm that, at these stages, DHA was able to modulate the cell membrane as well as interact with one of its known receptors, the presence of FFAR4 on COCs, 2-cell stage embryos and expanded blastocysts was determined by using immunohistochemistry (Figure 2.).

Experiment 2. *Effect of adding DHA to oocyte maturation medium on the development and quality of *in vitro* produced bovine embryos.*

To determine which concentration of DHA is beneficial for the embryonic development, oocyte-cumulus complexes were matured in IVM medium supplemented with 20 μ M of DHA (IVMDHA20) or with 100 μ M of DHA (IVMDHA100). DHA has been diluted in DMSO. For each concentration of DHA, the concentration of DMSO was adjusted. In this way, the 20 μ M DHA was diluted in 0.02% DMSO and the 100 μ M DHA was diluted in 0.1% DMSO. To avoid oxidation following the addition of DHA, carnosine was added at 5 μ g/mL. All oocytes were *in vitro* fertilised and cultured in serum free medium (IVDC). After 7 days of *in vitro* culture, all grade-1 blastocysts were slow frozen. After thawing, cryosurvival of embryos

were evaluated by recultivated embryos during 48h and by recording the re-expansion and hatching rate. At the end of the cryosurvival evaluation, to evaluate the embryos quality, immunostaining of SOX2 was realised. 5 experimental groups of 297 to 800 COCs were formed, and 11 independent experiments were realised:

- IVMC: 4g/L BSA FAF + EGF 10ng/mL + 10µg/mL pFSH/pLH + 1µg/mL 17β-oestradiol + 5µg/mL gentamicin + 10% FCS, diluted in TCM-199 (n = 800)
- IVMDHA20: IVMc + 20µM DHA in 0.02% DMSO + 5µg/mL carnosine (n = 297)
- IVMDHA100: IVMc + 100µM DHA in 0.1% DMSO + 5µg/mL carnosine (n = 499)
- IVMDMSO 0.02: IVMc + 0.02% DMSO (n = 773)
- IVMDMSO 0.1: IVMc + 0.1% DMSO (n = 492)
- IVMCARN: IVMc + 5µg/mL carnosine (n = 458)

Experiment 3. *Effect of adding 20µM of DHA to oocyte maturation medium and/or to embryo development medium on the development and quality of in vitro produced bovine embryos.*

To assess the effects of DHA supplementation throughout embryonic culture, the cumulus oocyte complex were matured in IVM medium in absence (IVMC) or presence of 20µM of DHA and carnosine 5 µg/mL (IVMDHA20) and *in vitro* cultured in IVD medium in absence (IVDC) or presence of 20µM of DHA and carnosine 5 µg/mL (IVDDHA20) until the freezing day (D7 or D8) (Figure 1.).

Four experimental groups were formed:

- IVMC/IVDC
- IVMC/IVDDHA20
- IVMDHA20/IVDC
- IVMDHA20/IVDDHA20

After 7 and 8 days of *in vitro* culture, all grade-1 blastocysts were slow frozen. After thawing, cryosurvival of embryos were evaluated by recultivated embryos during 48h and by recording the re-expansion and hatching rate. At the end of the cryosurvival evaluation, to assess the embryos quality, immunostaining of SOX2 was realised, at D9 or D10 depending on the day of slow freezing (Figure 1.). To prevent DHA from interfering with sperm and impacting fertilisation rates, the IVF medium has not been supplemented.

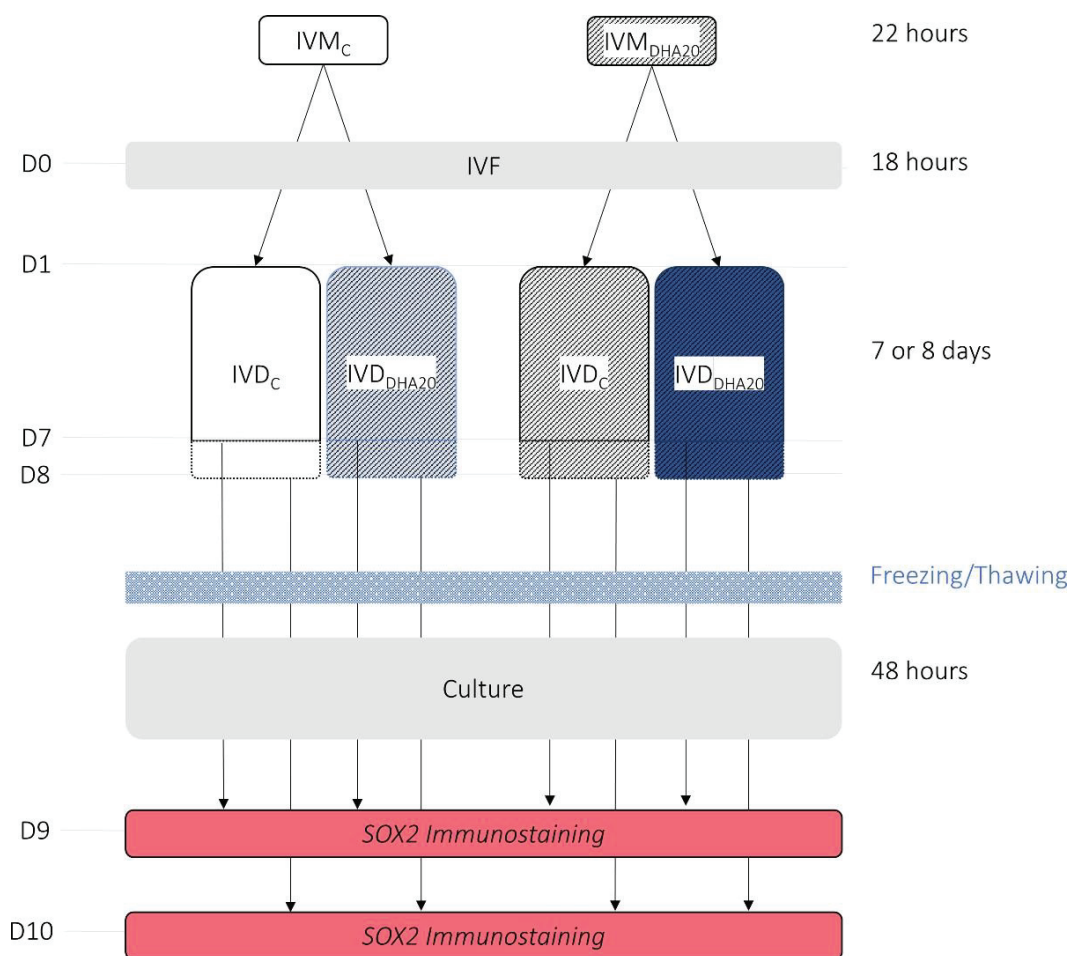


Figure 1. Experimental design of experiment 3.

***In vitro* embryo production**

COCs were retrieved from bovine ovaries collected at a local slaughterhouse. Follicles from 2 to 8 mm in diameter were punctured with an 18G needle linked to a vacuum pump and added to a 50 mL Falcon tube containing 1 mL of flushing medium (Euroflush, IMV Technologies, L’Aigle, France) maintained at 37 °C. For experiments 2 and 3, a total of 5,219 COCs were used.

The recovered COCs were selected under a stereomicroscope. Only COCs with at least three layers of compact cumulus cells, with homogenous and non-granular cytoplasm, were selected [59] and washed two times in Euroflush at 37 °C and then a third time in serum-free IVM medium before undergoing maturation for 18 h. The maturation medium comprised TCM-199, supplemented with 4g/L fatty acid free (FAF) bovine serum albumin (BSA), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 10 µg/mL porcine follicle-stimulating hormone (pFSH)/porcine luteinising hormone (pLH), 1 µg/mL 17β-oestradiol and 5 µg/mL gentamycin. All COCs were incubated at 38.5 °C for 22 h under a maximally humidity atmosphere with 5% CO₂.

IVF was performed as described previously [60]. The same semen from the same bull and the same ejaculate were used for all the experiments. Therefore, there is no male effect among the experiments.

Eighteen hours after fertilisation, all presumptive zygotes were cleared of cumulus cells and of spermatozoa attached to the zona pellucida by centrifugation. Zygotes were washed twice in Euroflush then twice in IVD medium. Zygotes were cultured in a 30 µL micro-drop of IVD medium at 38.5 °C in a maximally humidified atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ and covered with mineral oil (Liquid Paraffin, Origio, Måløv, Denmark). IVDC medium consisted of a serum-free, synthetic oviductal fluid control (SOFC) whose composition is described in [61], supplemented with 6 g/L of FAF BSA.

The zygote cleavage rate was assessed under a stereoscopic microscope at 20× magnification 48 h post-fertilisation (D2). The total developmental rate at D6 was evaluated by considering the structures developed from the morula to blastocyst stage. Additionally, the blastocyst developmental rate and embryo quality were recorded on D6–D8 (D0 = day of IVF), according to the International Embryo Technology Society (IETS) morphological criteria (Chapter 9 and Annex D, IETS Manual, 3rd edition). Only expanded grade-1 blastocysts were used for the quality assessment experiment – that is, expanded blastocysts with a compact inner cell mass, uniformly coloured blastomeres, few irregularities or excluded cells and an intact and smooth zona pellucida. Considering that expanded grade-1 blastocysts were removed on D7 for freezing, the rates of expanded grade-1 blastocysts on D8 include those frozen on D7 and those that newly appeared on D8.

Embryo freezing and thawing

Embryos were frozen slowly in ethylene glycol sucrose solution, following a protocol described previously [60]. Briefly, expanded grade-1 blastocysts were washed in embryo-holding medium (EHM, IMV Technologies, L'Aigle, France). Then, embryos were placed in 1.5 M ethylene glycol freezing medium (IMV Technologies) supplemented with 0.1 M sucrose for 10 min at room temperature. Embryos were mounted in groups of up to 9 embryos in 250 µL straws. The straws were placed in the cryochamber of the freezer (Freeze Control®, Cryologic, Melbourne, Australia), previously equilibrated at -6 °C. After 2 min at -6 °C, the seeding was induced manually. The temperature was lowered at a rate of 0.3 °C/min, down to -32 °C. When this temperature was reached, the straws were directly immersed in liquid nitrogen at -196 °C, before being stored.

For post-thawed experiments, straws containing the embryos were thawed for 3 s in ambient air and then immersed in a water bath at 35 °C for 30 s. Their contents were poured into a Petri dish, thus

mixing the different phases. After 15 min at room temperature, the embryos were washed for 5 min in EHM at room temperature. Finally, the embryos were washed and then cultured in SOF (Minitüb, GmbH, Tiefenbach, Germany), supplemented with 2% of minimum essential media (MEM) and 1% of basal medium eagle (BME), 0.33 mg/mL sodium pyruvate, 1% oestrus cow serum and 6g/L FAF BSA, in the incubator under 5% CO₂, 5% O₂ at 38.5 °C for 48 h. The cryosurvival of the embryos was evaluated at 24 and 48 h post-thawing, by recording the re-expansion and hatching rates.

Immunofluorescence

The presence of FFAR4 (also known as GPR120), a receptor able to bind DHA, was determined by immunohistochemistry on COCs, embryos at the 2-cell stage and expanded blastocysts, as described previously [27]. Briefly, COCs, 2-cell stage embryos and expanded blastocysts were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min. Following 15 min of permeabilization in 0.5% Triton in PBS, oocytes and embryos were incubated in PBS with 10% FCS for 3 h and in PBS with 5% FCS and 2% BSA for 2 h. The FFAR4 antibody was produced in rabbits (homemade antibody). Samples were then incubated at 4 °C overnight with rabbit anti-FFAR4 (9.5 ng/mL) or rabbit IgG before immunisation for the negative control (same concentration), both diluted in PBS with 2% BSA. After four washes in PBS with 0.2% BSA, samples were incubated in the dark with secondary antibody, Alexa Fluor488–conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, Saint Aubin, France) diluted 3:1000 for 3 h at ambient temperature. Another four washes in PBS with 0.2% BSA were performed, and the nuclei of the samples were counter-labelled with Hoechst 33342 (5 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) for 6 min at 37 °C.

After the cryosurvival evaluation, all surviving embryos were co-immunolabeled with SOX2 and CDX2 to assess the state of pluripotency as well as the proliferation of the trophectoderm [12]. Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. The blastocysts were then washed twice in a solution of TCM199 HEPES, supplemented with 0.1% Triton and 2% FCS, for 5 min. Embryos were permeabilised in PBS, 0.5% Triton, 1% BSA and 10% FCS, for 1 h at 37 °C. Embryos were incubated with two primary antibodies, goat polyclonal anti-SOX2 (AF2018, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) and mouse monoclonal anti-CDX2 IgG (sc-166830, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), diluted 1/250 and 1/200, respectively, in PBS supplemented with 0.1% Triton and 1% BSA for 1 h at 37 °C. The embryos were then rinsed for 45 min in the rinsing solution at room temperature. Then, they were incubated with two polyclonal secondary antibodies, anti-goat IgG conjugated to indocarbocyanine Cy3 (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania, USA) and anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor 488

(Abcam, Cambridge, United Kingdom), diluted 1:1500 in PBS containing 0.1% Triton and 1% BSA for 1 h at 37 °C. After 45 min of washing, the nuclei of the embryos were counter-labelled with Hoechst 33342 (5 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific) for 6 min at 37 °C. After rinsing, the embryos were mounted on slides in mounting medium (Fluoromount-G™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific).

Confocal microscope and image processing

A confocal laser scanning microscope (LSM700, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Munich, Germany) was used to examine the immunofluorescence. This microscope is driven by the Zen black acquisition software (ZEISS). The acquisition parameters were as follows: objective 20×0.8; gain between 700 and 800 depending on the channel; laser power between 0.3% and 4.5%; excitation of Alexa Fluor 488 at 488 nm, Cy3 at 555 nm and Hoechst 33342 at 405 nm; optimal resolution of 2048×2048 pixels/image; scanner speed at 7 (scanning time 0.79 µs/pixel, or 23.23s/image); acquisition interval of 1.00 µm for z-images.

To acquire the images of FFAR4 immunofluorescence, ‘Snap’ using the ZEN black software (release 2009) was performed. Z-images of SOX2/CDX2 immunofluorescence were acquired with ‘Z-stack’ using the ZEN black software. This process compiles several images with varying focal planes to produce an image with a greater depth of field. To exploit and extract information concerning the number of cells, the following image treatments have been applied: ‘Maximum intensity projection’, which allows projecting the pixel with the highest value on the z-axis so that in a single two-dimensional image all the dense structures of a given volume are observed, and ‘Filter median’, to reduce the noise of the image. Cell counting was then performed with Fiji software (Image J, release 2.3.0, National Institutes of Health, Bethesda, MD) using the ‘Multi-point Tool’, which allows manual counting.

Statistical analysis

Data analysis was performed by using SAS software (Statistical Analysis Software release 9.4). For qualitative data, multivariate analyses were performed by using logistic regression mixed models with post hoc Tukey–Kramer correction (GLIMMIX procedure), including the fixed effect of the experimental group and the random effect of the embryo production session. For the cryosurvival and immunostaining data, the fixed effect of the freezing day was added to the model as well as its interaction with the experimental group. For quantitative data, the MIXED procedure was performed with post hoc Tukey–Kramer correction, the fixed effect of the experimental condition and the

random effect of embryo production session. For the immunostaining data, the fixed effect of the freezing day was added to the model as well as its interaction with the experimental group. The differences were considered significant when p -adjusted < 0.05 . The data are presented in the tables and figures as the adjusted least squares mean \pm standard error of the mean are presented.

Results and discussion

Experiment 1. Free fatty acid receptor, FFAR4, in COCs, 2-cell stage embryos and expanded blastocysts.

FFAR4 protein was detected by immunofluorescence in both COCs, 2-cell grade embryos and expanded blastocysts using a customized specific antibody against bovine FFAR4 protein (Figure 2.). The green fluorescence corresponding to FFAR4 protein was localised preferentially at the periphery of cumulus cells, and only cytoplasm but not nuclear staining was observed (Figure 2 A.). Concerning the 2-cell stage embryos the staining level was high and evenly distributed between cytoplasm and nuclei (Figure 2 B.). Regarding the expanded blastocyst, the immunostaining seemed to be localised similarly to the Hoechst labelling (white arrows on Figure 2 C.), which would mean that FFAR4 was localised at the nuclear level in addition to be localised at the cytoplasmic level (Figure 2 C.).

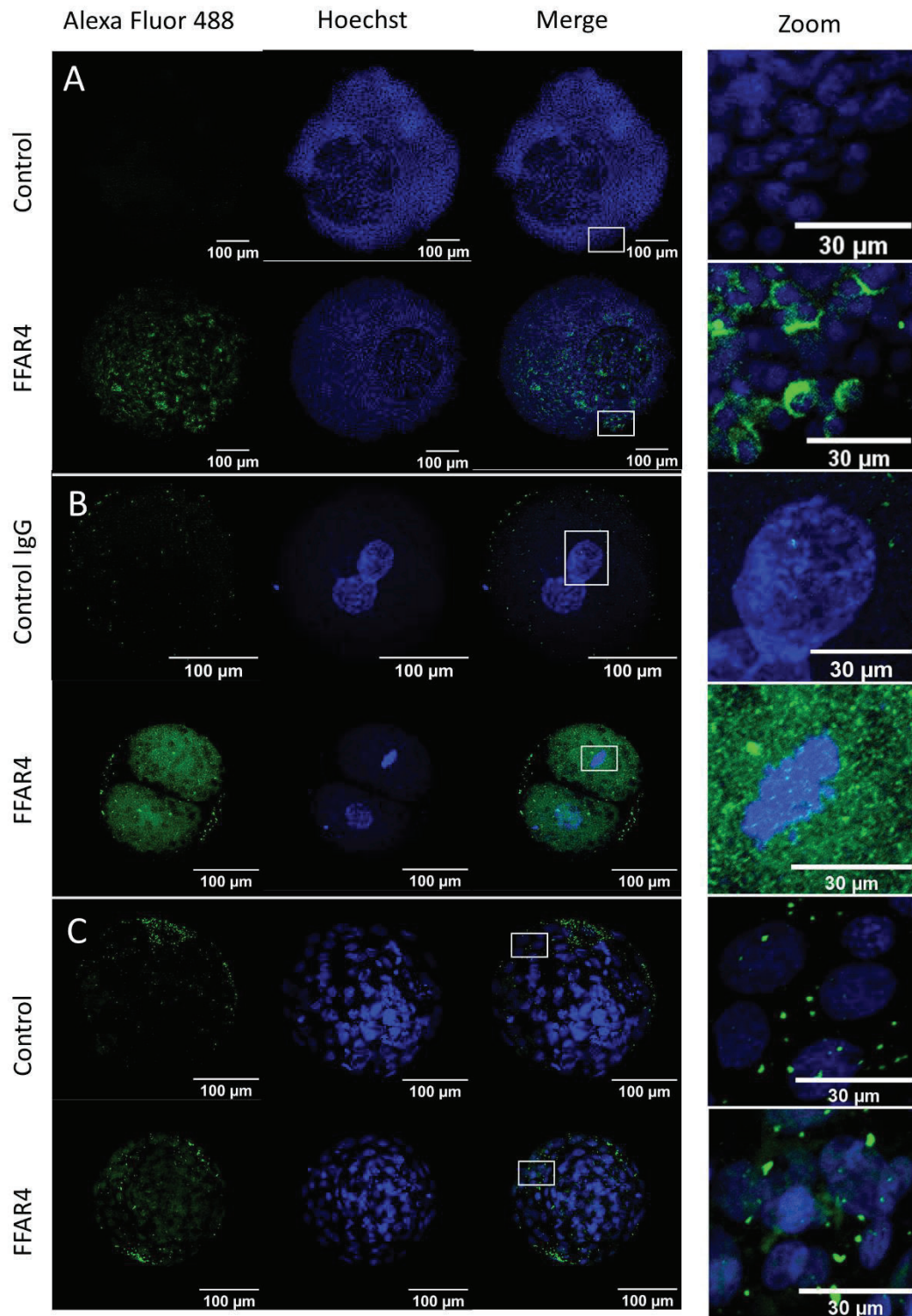


Figure 2. Intracellular localisation of FFAR4 protein by immunofluorescence, in **(A)** bovine oocyte-cumulus complex, **(B)** 2-cell grade embryo and **(C)** in expanded blastocyst. Rabbit IgG from before immunisation was used as the negative control (Control IgG). Hoechst blue staining indicate nuclei. Arrow in expanded blastocyst indicate a nuclear labelling of FFAR4.

We have reported the presence of FFAR4 not only in COCs, as previously described [27], but also in 2-cell embryos and D7 blastocysts. The presence of FFAR4, a membrane receptor able to bind DHA, suggests that DHA might exert an effect throughout oocyte maturation to the early steps of embryo development. It has been reported that FFAR4 is present on bovine oocytes and cumulus cells [27] and that its pharmacological activation by the agonist TUG891 would reproduce in part the effects of DHA supplementation, by increasing the developmental rate [27]. These results suggest that in addition to exerting a mechanical effect on membrane fluidity, DHA could also exert signaling effects up to the blastocyst stage. It is therefore interesting to assess the DHA effects not only during oocyte maturation but also during IVD of bovine embryos to assess its beneficial effect.

Experiment 2. *Effect DHA during oocyte maturation on the development and quality of in vitro produced bovine embryos*

The addition of DHA in IVM medium, at 20 or 100µM did not affect the developmental rates and the quality of expanded blastocysts at D7 and D8. Carnosine 5µg/mL or DMSO 0.02 or 0.1% in the maturation medium did not induce any change in the developmental rates compared to the control (Figure 3.).

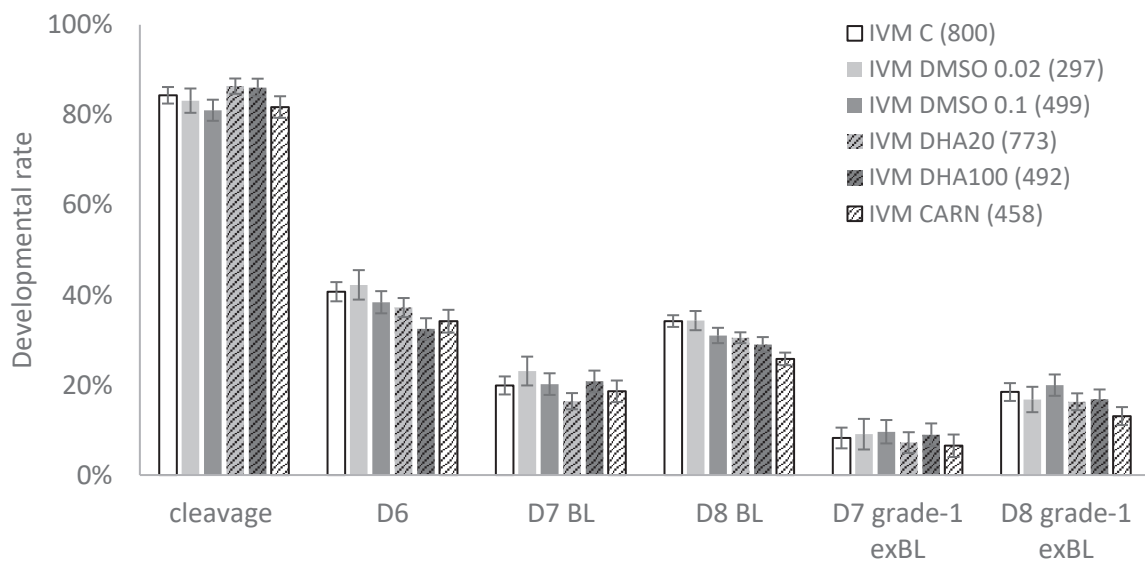


Figure 3. Developmental rates of bovine oocytes treated with DHA 20 or 100µM. The cleavage rate was checked at day 2, the development rate at D6 (morulas + blastocysts), the blastocyst rate at D7 and D8 and the expanded grade-1 blastocyst rate at D7 and D8. The developmental rates were presented as LSmean ± sem of 11 independent experiments. The total number of COCs used per condition is noted in the legend of the figure. Differences were considered significant when p adjusted < 0.05. LSmeans ± sem = Least-square means ± standard error of means.

In the present study, the addition of 20 or 100 μM DHA in the IVM medium did not affect the developmental and cryosurvival rates. These results are partly in agreement with the literature. In fact, concerning the developmental rate, the addition of 12.5 or 25 μM DHA to the IVM of porcine oocytes did not alter the cleavage and blastocyst rates compared with the control [28]. When 1 or 10 μM DHA was added to the IVM medium of bovine oocytes, the cleavage and the blastocyst rate were increased. A higher DHA dose, 100 μM , decreased both the cleavage and blastocyst rates [22], contrary to the present study. These discrepancies among studies could be partly due to differences in medium compositions, a factor that makes rigorous comparisons difficult. It is possible that this difference is due to the fact that serum-free media were used in the present study, because serum is known to accelerate the developmental kinetics of in vitro-produced embryos [29]. In contrast to the literature, the antioxidant used in the present study, carnosine – which is physiologically present in bovine oviductal fluid after ovulation [30], – did not affect the developmental kinetics of embryos. It had been reported that embryos cultured in vitro with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carnosine showed increased developmental kinetics, particularly between the cleavage and the compaction of the morula [26]. In fact, the kinetic from 4-cell stage to compaction was shorter when embryos were cultured in the presence of carnosine compared with control (59.9 vs 51.8 hours). We therefore expected to observe an increased developmental rate at D6 (morulae + blastocysts). However, we did not observe an increase at D6 or after. Contrary to our study, carnosine was only added in the IVD medium containing serum; this could suggest that the carnosine effect depends on serum. The addition of an antioxidant to culture media, to counter the oxidative effect of long-chain fatty acids, is used frequently and allows maintaining antioxidant stability in culture system by reducing the intracellular levels of oxygen reactive species [31].

After thawing, the re-expansion and hatching rates did not differ between groups (Table 1). The presence of carnosine or DMSO at different concentrations did not affect the cryosurvival rate compared with the control.

Table 1. Re-expansion and hatching rate of grade-1 expanded blastocysts *in vitro* matured in presence of 20 or 100 μM of DHA, after warming and 24 and 48h of culture.

	Thawed embryos	Reexpansion rate (% LSmean \pm sem)		Hatched embryos (% LSmean \pm sem)
	n	After 24h	After 48h	After 48h
Groups (<i>p</i> adjusted)		0.338	0.219	0.304
IVM _C	49	91.9 \pm 3.9	91.8 \pm 3.9	69.4 \pm 6.6
IVM _{DMSO 0.02}	32	95.3 \pm 4.6	90.5 \pm 6.4	66.7 \pm 10.3
IVM _{DMSO 0.1}	21	93.7 \pm 4.3	96.9 \pm 3.1	87.5 \pm 5.8
IVM _{DHA20}	52	84.8 \pm 5.0	78.9 \pm 5.7	69.2 \pm 6.4
IVM _{DHA100}	32	77.9 \pm 7.5	78.1 \pm 7.3	59.4 \pm 8.7
IVM _{CARN}	21	90.4 \pm 6.5	85.7 \pm 7.6	76.2 \pm 9.3

Please see the Materials and Methods for full details of the groups. The data are presented as the least squares mean \pm standard error of the mean. Data within the same column and experiment with different superscripts are statistically different (*p*-adjusted < 0.05).

There were no differences in the cryosurvival rate, indicating that 20 or 100 μM of DHA did not affect the cryosurvival of the expanded grade-1 blastocysts frozen slowly on D7. The addition of carnosine did not affect the cryosurvival rate, a finding in contrast to the literature. Indeed, authors reported that 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carnosine in the culture medium increased the cryosurvival rate 48 h after thawing compared with the control condition (70.4% vs 40.0%) [26]. It is possible that when combined with serum, carnosine would allow obtaining better quality embryos, more capable of withstanding the freezing process. Similar results were obtained when embryos were cultured in medium containing serum and in the presence of 0.5 μM of resveratrol, a flavonoid antioxidant. Indeed, the authors demonstrated that the addition of resveratrol increased the cryosurvival rate (54.2% vs. 68.3%) [32].

The addition of DHA, DMSO or carnosine in IVM medium did not affect the proportion of embryos with SOX2-positive cells (*p* = 0.885). The number of cells and SOX2-positive cells did not differ between the groups (Table 2). Only the percentage of SOX2-positive cells differed. In fact, when COCs were matured *in vitro* in the presence of 20 μM DHA, the percentage of SOX2-positive cells was lower compared with the control (8.4% \pm 0.8% vs 13.7% \pm 1.2%, *p* < 0.0001). This decrease could be explained by the fact that the embryos whose oocytes were matured *in vitro* in the presence of 20 μM DHA have, on average, more cells than the embryos whose oocytes were matured *in vitro* in the control condition (193.8 \pm 15.4 vs 143.1 \pm 12.9). Moreover, while there was not a significant difference between the groups, the addition of 20 μM DHA led to the highest percentage of embryos with SOX2 staining (86.7% vs 78.7% for the control).

Table 2. Number of total cell number and SOX2 positive cells in grade-1 expanded blastocysts at D9 of development, 48h post warming.

Groups (<i>p adjusted</i>)	n	% Embryos with SOX2 cells	No of cells (LSmean \pm sem)		mean ratio (% LSmean \pm sem)
			Total cells	SOX2 cells	SOX2/Total cells
		0.885	0.263	0.887	<0.0001
IVM _c	35	78.7 \pm 9.2	143.1 \pm 12.9	19.2 \pm 3.4	13.7 \pm 1.2 ^a
IVM _{DMSO 0.02}	27	81.5 \pm 10.7	165.9 \pm 15.9	17.1 \pm 4.1	11.2 \pm 1.1 ^{a,b}
IVM _{DMSO 0.1}	43	83.8 \pm 7.7	162.4 \pm 11.4	17.5 \pm 3.0	11.0 \pm 8.4 ^b
IVM _{DHA20}	23	86.7 \pm 8.4	193.8 \pm 15.4	16.5 \pm 3.9	8.4 \pm 0.8 ^c
IVM _{DHA100}	24	71.4 \pm 12.5	157.6 \pm 17.1	16.4 \pm 4.4	10.4 \pm 1.1 ^{b,c}
IVM _{CARN}	17	82.8 \pm 13.0	169.5 \pm 21.8	23.9 \pm 5.5	13.3 \pm 1.4 ^{a,b}

Please see the Materials and Methods for full details of the groups. The data are presented as the least squares mean \pm standard error of the mean. Data within the same column and experiment with different superscripts are statistically different (*p*-adjusted < 0.05).

A preliminary experiment showed that the percentage of SOX2-positive cells decreased between D7 and D9. At D7, 41.6% of the cells expressed SOX2 while at D9 only 15.1% expressed SOX2. In addition, proliferation of the trophectoderm was observed between D7 and D9 (183.3 vs 334.6 cells) (Supplementary Figure 1). By performing immunostaining on D9 embryos, we expected to obtain embryos with more cells and a reduced ratio of SOX2-positive cells to total cells.

Regarding the cryosurvival rate, the addition of DHA, DMSO and carnosine in IVM medium did not show a significant effect on the number of cells and SOX2-positive cells in blastocysts after thawing. Although the differences in the number of cells were not significant, embryos exposed to 20 μ M DHA in the IVM medium had a lower percentage of SOX2-positive cells. An increase in the number of cells at D9 and a corresponding decrease in the number of SOX2-positive cells was expected, compared with D7 expanded grade-1 blastocysts (Supplementary Figure 1). Thus, the addition of 20 μ M DHA in the IVM medium appears to be beneficial to embryo development, allowing a reduction in the percentage of SOX2-positive cells due to an increase in the number of cells, probably at the origin of cell allocation of the first embryo cell lines.

DHA has already been reported to affect cellular functions through several mechanisms: transcription factor regulation, arachidonic acid production, membrane lipid composition modification or through receptor binding [24]. Indeed, DHA is not only a component of membranes but it can activate receptors such as FFAR4 and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR, part of the β -oxidation pathway) [27,33].

The lower percentage of SOX2-positive cells in DHA-treated embryos could be related to the higher number of cells and, therefore, to a DHA effect on cell proliferation. Indeed, 20 μ M DHA stimulated cell

proliferation and steroidogenesis in bovine granulosa cells [25], through FFAR4 and not PPAR for cell proliferation. TUG-891, a FFAR4 agonist, mirrored the effects of DHA on granulosa cell proliferation. Thus, FFAR4 could activate the extracellular signal-regulating kinase (ERK)1/2 pathway and activate the transcription factors linked to cell proliferation [27,33].

The establishment of cell lines during pre-implantation development should be related to a decrease in the expression of some pluripotency factors because some of the cells engage in a developmentally restricted process (TE and the hypoblast). Thus, the decrease in the number of SOX2-positive cells is linked to its restriction to the primary epiblast [11]. In addition, in line with these results, researchers have shown that in mice, the expression of GATA-binding protein 6 (GATA6), which is a known marker of the hypoblast [34], seems to repress SOX2 expression [13]. The establishment of these tissues and their allocation during early stages of development in cattle is therefore a quality criterion [7,8]. Hence, DHA treatment leading to higher rate of SOX2-positive embryos could also suggest that when treated with DHA, embryos have a better transfer potential.

Considering all the results, we hypothesize that despite the absence of change in the developmental rate, the more favourable percentage of SOX2-positive cells observed in embryos treated with 20 μ M DHA during IVM could result in a higher pregnancy rate. Future studies should thus focus on embryo transfer of such embryos to confirm this hypothesis.

Experiment 3. Effect of adding DHA to oocyte maturation medium and/or to the embryos culture medium on the development and quality of in vitro produced bovine embryos.

The addition of 20 μ M of DHA to oocyte maturation medium and/or to the embryo culture medium did not affect developmental rates (Figure 4.): cleavage, D6 morula and blastocyst rate, D7 and D8 blastocysts rate. However, DHA at 20 μ M affected embryonic quality at 7 and 8 days of development. Indeed, the addition of DHA at 20 μ M during the whole development (IVM + IVD) decreased the grade-1 blastocyst rate at D7 compared to the control, $6.9 \pm 1.2\%$ vs. $12.8 \pm 1.6\%$, respectively (p adjusted = 0.041) (Figure 4.). When added only in the maturation medium, it decreased the grade-1 expanded blastocyst rate at D8 compared to the control, $14.7 \pm 2.3\%$ vs. $22.2 \pm 2.7\%$, respectively (p adjusted = 0.045) (Figure 4.). No difference was observed when DHA 20 μ M was only added to the IVD medium.

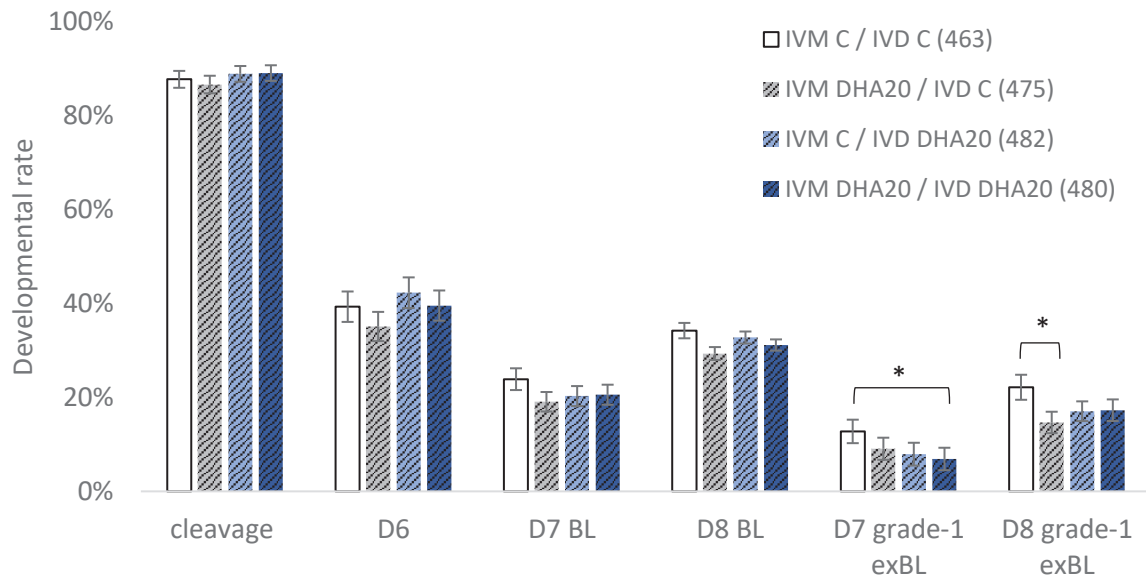


Figure 4. Effect of adding DHA to oocyte maturation medium and/or to the embryos culture medium on the developmental rates. The cleavage rate was checked at day 2, the development rate at D6 (morulas + blastocysts), the blastocysts rate at D7 and D8 and the expanded grade-1 blastocyst at D7 and D8. The developmental rates were represented as LSmean \pm sem of 11 independent experiments. Number of total COCs used has been noted in the legend of the figure. Differences were considered significant at p adjusted < 0.05 . LSmeans \pm sem = Least-square means \pm standard error of means.

When added during the entire development (IVM + IVD), 20 μ M DHA decreased the quality of the embryos, corresponding to a lower developmental rate of expanded grade-1 blastocysts at D7, without a change on D8, and therefore not explained by a developmental delay. When added during IVM only, 20 μ M DHA reduced the embryo quality by decreasing the developmental rate of expanded grade-1 blastocysts on D8, without a change on D7. These results were not observed in the previous experiment that was performed with more embryos. Hence, the difference observed here could be due to the lower number of embryos per groups (475 vs. 773 COCs).

Within pre-ovulatory granulosa cells, PPAR are expressed and the endogenous n-3 PUFA found in follicular fluid would probably not saturate PPAR due to their low concentration (0.2–1.5 μ M) [35]. In the present study, 20 μ M DHA was added directly to the IVM medium. It can therefore be assumed that DHA would saturate PPAR. However, the activation of PPAR γ and PPAR α through the PPAR agonist rosiglitazone during IVM of mouse oocytes resulted in a dose dependent reduction in β -oxidation and a decrease in the blastocyst developmental rate [36]. In addition, FFAR4 activation through the TUG891 agonist increased the expression of PPAR α in bovine granulosa cells [37]. Moreover, PPAR γ increases fat storage and decreases β -oxidation [38]. Even though DHA acts through several mechanisms, some of which are potentially beneficial to the oocyte or embryo, the concomitant activation of PPAR γ by n-3 PUFA during IVM would induce lipid storage in lipid droplets of COCs and compromise the

developmental competence of embryos [39]. Thus, PPAR activation could potentially nullify other mechanisms that would potentially mediate the beneficial effects of DHA on embryos.

When DHA was added during IVD only, there was no effect on the quality of the embryos, which is in line with previous studies in which 1, 10 or 100 μM DHA added to the IVD medium of bovine embryos changed neither the cleavage rate nor the D8 blastocyst developmental rate [40]. It is therefore possible that the difference in the results comparing the DHA effects during IVM or IVD might be due to the presence of cumulus cells expressing PPAR. To confirm these hypotheses, it would be interesting to measure the expression of PPAR in expanded blastocysts and to assess the DHA effects while blocking PPAR activation.

After thawing, the re-expansion and hatching rates did not differ between the groups, indicating that 20 μM DHA in the oocyte maturation medium and/or the embryo culture medium did not affect the cryosurvival of the expanded grade-1 blastocysts at D9 or D10 depending on the freezing day. There was no effect of the freezing day and the experimental group on re-expansion and hatching rates (Table 3). However, there was a tendency for a decreased hatching rate in embryos frozen on D8 compared with embryos frozen on D7 (61.4% vs 71.5%, $p = 0.079$).

Table 3. Effect of adding 20µM of DHA to oocyte maturation medium and/or to the embryos culture medium on the cryosurvival rate of the grade-1 expanded blastocysts, 24 and 48h post thawing.

	Freezing day	Thawed embryos n	Re-expansion rate (% LSmean ± sem)		Hatched embryos (% LSmean ± sem)	
			After 24h	After 48h	After 48h	
<i>P value freezing day</i>			0.492	0.856	0.079	
	D7	161	88.0 ± 2.6	84.1 ± 3.7	71.5 ± 4.3	
	D8	153	85.3 ± 2.9	83.3 ± 3.9	61.4 ± 4.9	
<i>P value groups</i>			0.799	0.626	0.244	
	IVM _C / IVD _C	85	89.4 ± 3.2	86.2 ± 4.1	74.5 ± 5.0	
	IVM _{DHA20} / IVD _C	65	84.0 ± 4.7	79.1 ± 5.9	63.2 ± 6.8	
	IVM _C / IVD _{DHA20}	77	86.2 ± 4.0	86.3 ± 4.4	68.0 ± 6.0	
	IVM _{DHA20} / IVD _{DHA20}	77	86.7 ± 3.9	82.4 ± 5.3	59.9 ± 6.3	
<i>P value freezing day * groups</i>			0.679	0.045	0.169	
	IVM _C / IVD _C	D7	53	90.6 ± 4.0	88.6 ± 4.7	79.4 ± 5.8
	IVM _{DHA20} / IVD _C	D7	41	87.8 ± 5.1	85.5 ± 5.9	73.7 ± 7.2
	IVM _C / IVD _{DHA20}	D7	36	88.9 ± 5.2	89.1 ± 5.4	75.9 ± 7.4
	IVM _{DHA20} / IVD _{DHA20}	D7	31	83.9 ± 6.6	67.8 ± 9.2	53.8 ± 9.5
	IVM _C / IVD _C	D8	42	88.1 ± 5.0	83.4 ± 6.2	68.9 ± 7.5
	IVM _{DHA20} / IVD _C	D8	24	79.2 ± 8.3	70.9 ± 10.0	51.3 ± 10.6
	IVM _C / IVD _{DHA20}	D8	41	82.9 ± 5.9	83.0 ± 6.4	58.9 ± 8.2
	IVM _{DHA20} / IVD _{DHA20}	D8	46	89.1 ± 4.6	91.3 ± 4.4	65.7 ± 7.4

Please see the Materials and Methods for full details of the groups. The data are presented as the least squares mean ± standard error of the mean. Data within the same columns and experiment with different superscripts are statistically different (p-adjusted < 0.05).

In the absence of serum, embryos exhibit slower development [2], which is why, in the present study, expanded grade-1 blastocysts were frozen on both D7 and D8. There was no difference in cryosurvival according to the group or the freezing day, except for a tendency for a lower hatching rate in embryos frozen on D8. This study confirmed that the expanded grade-1 blastocysts at D8 were of lower quality [41,42] or suggested that they could be more sensitive to the freezing/thawing process compared with morphologically similar embryos observed one day earlier (D7). These results are in line with the literature. Indeed, the survival rates were higher when embryos were frozen on D7 because freezing allowed the survival of a greater proportion of embryos of intermediate quality compared with embryos frozen on D8 [43]. On the contrary, the best quality embryos (grade 1) would exhibit similar survival rates whether they were frozen on D7 or D8 [43]. Therefore, we did not expect a cryosurvival difference between D7 and D8 expanded grade-1 blastocysts. For this reason, we focused on the hatching rate, which provides insights on further development, because without hatching, pregnancy is impossible. Taken together, these data confirmed that D7 or D8 grade-1 blastocysts would survive similarly [44]. DHA

treatment had no effect on cryosurvival when used during IVM, IVD or both.

Neither the freezing day nor the experimental group affected the proportion of embryos with SOX2-positive cells (experimental group effect $p = 0.322$, freezing day effect $p = 0.597$) (Table 4). While the experimental group did not affect the number of cells and SOX2-positive cells ($p = 0.238$ and $p = 0.358$, respectively), the freezing day has a significant effect (Table 4). In fact, D7 embryos exhibited more cells 48 h after thawing compared with D8 embryos (194.4 ± 9.0 vs 166.4 ± 10.0 , $p = 0.039$). Similarly, D7 embryos had more SOX2-positive cells 48 h after thawing compared with D8 embryos (26.5 ± 2.8 vs 16.2 ± 3.0 , $p = 0.006$). The percentage of SOX2-positive cells was affected by both the freezing day and the experimental group. D7 embryos exhibited a higher SOX2-positive cell percentage compared with D8 embryos ($13.06\% \pm 1.27\%$ vs $9.55\% \pm 1.0\%$, $p < 0.0001$). Regarding the experimental group effect, the percentage of SOX2-positive cells was reduced in the IVMc / IVDDhA20 group compared with the control ($8.4\% \pm 0.9\%$ vs $10.9\% \pm 1.1\%$, $p < 0.0001$). When DHA was supplemented during IVM or the entire culture process (IVM + IVD), the percentage of SOX2-positive cells was higher compared with the control group ($13.1\% \pm 1.4\%$, $p = 0.002$, and $13.3\% \pm 1.4\%$, $p = 0.0004$, respectively) (Table 4). There was a significant interaction between the freezing day and the experimental group effect for the SOX2-positive cell percentage, meaning that the results could vary among experimental groups depending on the freezing day.

Table 4. Number of total cell number and SOX2 positive cells in grade-1 expanded blastocysts at D9 or D10 of development, depending on the slow frozen day (D7 or D8), 48h post warming.

	n	Freezing day	No of Embryos with SOX2 cells (%LSmean \pm sem)	No of cells (LSmean \pm sem)		mean ratio (% LSmean \pm sem)
				Total cells	SOX2 cells	SOX2/Total cells
Freezing day (<i>p adjusted</i>)			0.597	0.039	0.006	< 0.0001
D7	111		66.1 \pm 7.4	194.4 \pm 9.0 ^a	26.5 \pm 2.8 ^a	13.06 \pm 1.27 ^a
D8	92		62.1 \pm 8.1	166.4 \pm 10.0 ^b	16.2 \pm 3.0 ^b	9.55 \pm 1.0 ^b
Groups (<i>p adjusted</i>)			0.322	0.238	0.358	< 0.0001
IVM _C / IVD _C	66		63.3 \pm 8.4	191.6 \pm 10.6	20.6 \pm 3.2	10.9 \pm 1.1 ^b
IVM _{DHA20} / IVD _C	46		59.7 \pm 10.3	169.0 \pm 15.7	23.2 \pm 4.5	13.1 \pm 1.4 ^a
IVM _C / IVD _{DHA20}	54		75.3 \pm 7.6	196.7 \pm 10.9	16.6 \pm 3.3	8.4 \pm 0.9 ^c
IVM _{DHA20} / IVD _{DHA20}	37		56.7 \pm 10.7	164.4 \pm 15.7	25.0 \pm 4.5	13.3 \pm 1.4 ^a
Freezing day * Groups (<i>p adjusted</i>)			0.193	0.157	0.134	< 0.0001
IVM _C / IVD _C	38	D7	62.8 \pm 10.0	191.2 \pm 13.2	23.3 \pm 3.9 ^{a,b}	12.0 \pm 1.2 ^b
IVM _{DHA20} / IVD _C	32	D7	74.8 \pm 9.2	197.8 \pm 14.0	25.9 \pm 4.0 ^{a,b}	12.0 \pm 1.2 ^b
IVM _C / IVD _{DHA20}	27	D7	68.0 \pm 10.6	194.2 \pm 16.2	18.4 \pm 4.6 ^{a,b}	9.6 \pm 1.1 ^c
IVM _{DHA20} / IVD _{DHA20}	14	D7	57.5 \pm 15.0	194.7 \pm 26.0	38.4 \pm 7.2 ^a	20.5 \pm 2.1 ^a
IVM _C / IVD _C	28	D8	63.8 \pm 10.9	192.0 \pm 16.7	18.0 \pm 4.7 ^{a,b}	9.3 \pm 1.0 ^{c,d}
IVM _{DHA20} / IVD _C	14	D8	42.5 \pm 14.9	140.2 \pm 28.1	20.4 \pm 7.7 ^{a,b}	14.2 \pm 1.8 ^b
IVM _C / IVD _{DHA20}	27	D8	81.4 \pm 8.6	199.2 \pm 14.7	14.8 \pm 4.2 ^{a,b}	7.4 \pm 0.8 ^d
IVM _{DHA20} / IVD _{DHA20}	23	D8	55.8 \pm 12.7	134.1 \pm 17.8	11.6 \pm 5.0 ^b	8.4 \pm 1.0 ^d

Please see the Materials and Methods for full details of the groups. The data are presented as the least squares mean \pm standard error of the mean. Data within the same columns and experiment with different superscripts are statistically different (*p*-adjusted < 0.05).

The freezing day affected the quality of embryos. Indeed, embryos frozen on D7 contained more cells, suggesting a higher quality embryo, alongside more SOX2-positive cells. In this case, the reduced SOX2-positive cell number and percentage reported in D8 embryos was associated with a reduced number of cells, despite being one day older, and were therefore not indicative of better quality. These D8 embryos could be of lower quality and could have more difficulties facing the freezing protocol compared with D7 embryos. Fewer cells could be the consequence of the destruction of some of the cells both in the trophectoderm and ICM [45].

Considering both D7 and D8 embryos, although the number of total cells and SOX2 cells were not different between the control and the group with DHA supplementation during only IVD, respectively (20.6 vs. 16.6 cells and 191.6 vs. 196.7 cells), the percentage of SOX2-positive cells was significantly

decreased allowed obtaining embryos with more cells together with a decrease in the percentage of SOX2-positive cells, suggesting accelerated development [46,47]. On the contrary, when embryos were supplemented with DHA during IVM or during IVM + IVD, embryos exhibited fewer cells and an increased percentage of SOX2-positive cells, suggesting slower development. Within embryonic stem cells, SOX2 overexpression induces ectodermal and mesodermal differentiation, while OCT4 overexpression induces mesodermal and endodermal differentiation [48]. Thus, more SOX2-positive cells in D9 embryos could induce unbalanced differentiation of the first embryonic layers. SOX2 overexpression after D9 could reflect a suboptimal embryo development [47]. Therefore, DHA supplementation during the entire culture process (IVM + IVD) could be detrimental to proper development. Lastly, even though the number of embryos was insufficient, the percentage of embryos expressing SOX2 was higher when DHA was supplemented during IVD (75.3% vs. 63.3%). An embryo without SOX2 expression would not be able to lead to a gestation, and future studies should focus on a transfer study to assess this issue. Even though the developmental rates are similar, DHA could increase the percentage of embryos expressing SOX2 and, consequently, the percentage of embryos that would lead to gestation. Failure of epiblast development has been described *in vitro* and *in vivo*, and several authors reported that between 23% and 65% of *in vitro* produced and transferred embryos no longer had an embryonic disc, as reviewed by Ramos-Ibeas et al. [9]. In our study, regardless of the freezing day, 27.4% to 43.3% of the embryos lacked SOX2 cells and therefore epiblast, after thawing and 48h of culture (Table 4). The post-thaw culture may be suboptimal and not suitable for the development of more demanding epiblast cells than trophectoderm cells [49–51]. Indeed, it would seem that the addition of 10% serum and 0.5% of glucose is beneficial for the proper development of hatched embryos [51] whose glycolytic activity and glucose uptake increase [52,53]. The addition of DHA into the IVD medium of these embryos could be a way to protect ICM cells from the freezing/thawing process.

Limitations of the study

We assessed the effect of DHA supplementation on *in vitro* oocyte and embryo quality. Nevertheless, DHA was combined with both DMSO and carnosine, an antioxidant to limit the oxidation of DHA and potentiate its effects, and thus we have reported the effect of this combination in the present study. However, DMSO is regularly used in media for the production and the cryopreservation of bovine embryos [27,37,54,55]. Due to its cellular toxicity and its impact on the maintenance of pluripotency [56], DMSO should only be used at a low concentration [57], which was the case in the present study. However, 0.1% DMSO seems to be sufficient to decrease the number of apoptotic cells in bovine embryos [58]. Moreover, 0.75% DMSO in IVM oocyte medium influenced the epigenome and increased SOX2 gene expression in bovine blastocysts [48]. In the present study, the 0.02% to 0.1% DMSO concentrations did not seem to affect SOX2 expression, similarly to what has been described in the literature [55,56]. As mentioned before, the real embryo quality assessment is performed through embryo transfer studies, which were not feasible here. The success rate after transfer of embryos supplemented with DHA during IVD could prove its efficacy for *in vitro* embryo production.

Conclusion

Despite the quality assessment still reside in morphological criteria, the quality of bovine embryos produced *in vitro* is highly variable and therefore cannot be linked to a single criterion such as the morphology of the embryo and/or its ability to hatch [50]. In this study we used SOX2 immunostaining to complete the study of embryonic quality after exposure of oocytes and embryos to DHA, during IVM and/or IVD. SOX2 positive cell evaluation of grade 1 blastocysts suggested that DHA might improve the embryo quality and also the rate of embryos expressing SOX2, therefore able to achieve a gestation. Future studies should thus confirm these results by carrying out embryo transfers to assess the beneficial effects of DHA supplementation

Acknowledgments : This research was funded by ALLICE and APIS-GENE under the project CRYOPTIM

Author Contributions: P.S., D.L.B., L.S., S.F. and S.E. conceived the experiment(s), S.J.I., V.S.F., and L.L.B. conducted the experiment(s). S.J.I. analysed the results. S.J.I., V.S.F. and S.E. wrote the main manuscript text. S.I.J., V.S.F., S.E., P.S., D.L.B., L.S., L.L.B., S. F., T.J. and S.B. reviewed the manuscript

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests

Supplementary data

MIV _c / CIV _c	No. of BE Q1 at D7	BE with SOX2+	Total Cell Number	SOX2 Cell Number	SOX2/Total Cell (%)
D7	19	100%	183.3 ± 16.9 ^a	76,4 ± 6.7 ^a	41,6 ± 2.0 ^a
D9	18	100%	334.6 ± 17.3 ^b	50.9 ± 6,8 ^b	15.1 ± 1.0 ^b
<i>P value day effect</i>			<0.0001	0.0028	<0.0001



Supplementary Figure 1. Evolution of SOX2 immunostaining between the 7th and the 9th day of development.

References

1. Moallem, U. Invited Review: Roles of Dietary n-3 Fatty Acids in Performance, Milk Fat Composition, and Reproductive and Immune Systems in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 2018, 101, 8641–8661, doi:10.3168/jds.2018-14772.
2. Rizos, D.; Gutiérrez-Adán, A.; Pérez-Garnelo, S.; De La Fuente, J.; Boland, M.P.; Lonergan, P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biol Reprod* 2003, 68, 236–243, doi:10.1095/biolreprod.102.007799.
3. Goissis, M.D.; Cibelli, J.B. Functional Characterization of CDX2 during Bovine Preimplantation Development in Vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2014, 81, 962–970, doi:10.1002/mrd.22415.
4. Shi, G.; Jin, Y. Role of Oct4 in Maintaining and Regaining Stem Cell Pluripotency. *Stem Cell Res Ther* 2010, 1, 39, doi:10.1186/scrt39.
5. Strumpf, D.; Mao, C.-A.; Yamanaka, Y.; Ralston, A.; Chawengsaksophak, K.; Beck, F.; Rossant, J. Cdx2 Is Required for Correct Cell Fate Specification and Differentiation of Trophectoderm in the Mouse Blastocyst. *Development* 2005, 132, 2093–2102, doi:10.1242/dev.01801.
6. Wooldridge, L.K.; Johnson, S.E.; Cockrum, R.R.; Ealy, A.D. Interleukin-6 Requires JAK to Stimulate Inner Cell Mass Expansion in Bovine Embryos. *Reproduction* 2019, 158, 303–312, doi:10.1530/REP-19-0286.
7. Surani, M.A.; Barton, S.C. Trophectoderm Vesicles of Preimplantation Blastocysts Can Enter into Quiescence in the Absence of Inner Cell Mass. *J Embryol Exp Morphol* 1977, 39, 273–277.
8. Van Soom, A.; Boerjan, M.; Ysebaert, M.T.; De Kruif, A. Cell Allocation to the Inner Cell Mass and the Trophectoderm in Bovine Embryos Cultured in Two Different Media. *Mol Reprod Dev* 1996, 45, 171–182, doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<171::AID-MRD10>3.0.CO;2-4.
9. Pérez-Gómez, A.; González-Brusi, L.; Bermejo-Álvarez, P.; Ramos-Ibeas, P. Lineage Differentiation Markers as a Proxy for Embryo Viability in Farm Ungulates. *Frontiers in Veterinary Science* 2021, 8, 671, doi:10.3389/fvets.2021.680539.
10. Marsico, T.V.; de Camargo, J.; Valente, R.S.; Sudano, M.J. Embryo Competence and Cryosurvival: Molecular and Cellular Features. *Anim Reprod* 2019, 16, 423–439, doi:10.21451/1984-3143-AR2019-0072.
11. Avilion, A.A. Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function. *Genes & Development* 2003, 17, 126–140, doi:10.1101/gad.224503.
12. Khan, D.R.; Dubé, D.; Gall, L.; Peynot, N.; Ruffini, S.; Laffont, L.; Le Bourhis, D.; Degrelle, S.; Jouneau, A.; Duranthon, V. Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. *PLoS ONE* 2012, 7, e34110, doi:10.1371/journal.pone.0034110.
13. Wicklow, E.; Blij, S.; Frum, T.; Hirate, Y.; Lang, R.A.; Sasaki, H.; Ralston, A. HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass Where It Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst. *PLoS Genet* 2014, 10, e1004618, doi:10.1371/journal.pgen.1004618.
14. Goissis, M.D.; Cibelli, J.B. Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. *Biology of Reproduction* 2014, 90, doi:10.1095/biolreprod.113.111526.
15. Mogas, T. Update on the Vitrification of Bovine Oocytes and In vitro-Produced Embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2019, 31, 105, doi:10.1071/RD18345.
16. Mucci, N.; Aller, J.; Kaiser, G.G.; Hozbor, F.; Cabodevila, J.; Alberio, R.H. Effect of Estrous Cow Serum during Bovine Embryo Culture on Blastocyst Development and Cryotolerance after Slow Freezing or Vitrification. *Theriogenology* 2006, 65, 1551–1562, doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.020.

17. Annes, K.; Sudano, M.J.; Belaz, K.R.A.; Tata, A.; Santos, V.G.; Fonseca Junior, A.M. da; Dos Santos, É.C.; Eberlin, M.N.; Milazzotto, M.P. Lipid Characterization of in Vitro-Produced Bovine Embryos with Distinct Kinetics of Development. *Zygote* 2019, 27, 413–422, doi:10.1017/S0967199419000534.
18. 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, 57–66, doi:10.1002/mrd.1131.
19. Amstislavsky, S.; Mokrousova, V.; Brusentsev, E.; Okotrub, K.; Comizzoli, P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. *Biopreservation and Biobanking* 2019, 17, 76–83, doi:10.1089/bio.2018.0039.
20. Lonergan, P.; Fair, T. In Vitro-Produced Bovine Embryos—Dealing with the Warts. *Theriogenology* 2008, 69, 17–22, doi:10.1016/j.theriogenology.2007.09.007.
21. Hishikawa, D.; Valentine, W.J.; Iizuka-Hishikawa, Y.; Shindou, H.; Shimizu, T. Metabolism and Functions of Docosahexaenoic Acid-containing Membrane Glycerophospholipids. *FEBS Lett* 2017, 591, 2730–2744, doi:10.1002/1873-3468.12825.
22. Osekria, M.; Elis, S.; Maillard, V.; Corbin, E.; Uzbekova, S. N-3 Polyunsaturated Fatty Acid DHA during IVM Affected Oocyte Developmental Competence in Cattle. *Theriogenology* 2016, 85, 1625-1634.e2, doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.019.
23. Freret, S.; Osekria, M.; Bourhis, D.L.; Desmarchais, A.; Briant, E.; Desnoes, O.; Dupont, M.; Le Berre, L.; Ghazouani, O.; Bertevello, P.S.; et al. Effects of a N-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Diet on Embryo Production in Dairy Cows. *Reproduction* 2019, 158, 71–83, doi:10.1530/REP-18-0644.
24. Calder, P.C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J. Nutr.* 2012, 142, 592S-599S, doi:10.3945/jn.111.155259.
25. Maillard, V.; Desmarchais, A.; Durcin, M.; Uzbekova, S.; Elis, S. Docosahexaenoic Acid (DHA) Effects on Proliferation and Steroidogenesis of Bovine Granulosa Cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2018, 16, 40, doi:10.1186/s12958-018-0357-7.
26. Le Bourhis, D.; Verachten, M.; Salvetti, P.; Hochet, M.; Schibler, L. Supplementation with Carnosine during in Vitro Culture Improves the Quality of in Vitro-Produced Bovine Embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2017, 29, 146, doi:10.1071/RDv29n1Ab78.
27. Elis, S.; Osekria, M.; Vitorino Carvalho, A.; Bertevello, P.S.; Corbin, E.; Teixeira-Gomes, A.-P.; Lecardonnell, J.; Archilla, C.; Duranthon, V.; Labas, V.; et al. Docosahexaenoic Acid Mechanisms of Action on the Bovine Oocyte-Cumulus Complex. *J Ovarian Res* 2017, 10, 74, doi:10.1186/s13048-017-0370-z.
28. Hoyos-Marulanda, V.; Alves, B.S.; Rosa, P.R.A.; Vieira, A.D.; Gasperin, B.G.; Mondadori, R.G.; Lucia, T. Effects of Polyunsaturated Fatty Acids on the Development of Pig Oocytes in Vitro Following Parthenogenetic Activation and on the Lipid Content of Oocytes and Embryos. *Animal Reproduction Science* 2019, 205, 150–155, doi:10.1016/j.anireprosci.2019.05.003.
29. Holm, P.; Booth, P.J.; Callesen, H. 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* 2002, 123, 553–565, doi:10.1530/rep.0.1230553.
30. Lamy, J.; Gatien, J.; Dubuisson, F.; Nadal-Desbarats, L.; Salvetti, P.; Mermillod, P.; Saint-Dizier, M. Metabolomic Profiling of Bovine Oviductal Fluid across the Oestrous Cycle Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Reprod. Fertil. Dev.* 2018, doi:10.1071/RD17389.
31. Nikoloff, N.; Campagna, A.; Luchetti, C.; Carranza-Martín, A.C.; Pascua, A.M.; Anchordoquy, J.M.; Anchordoquy, J.P.; Lombardo, D.M.; Seoane, A.; Furnus, C.C. Effects of EPA on Bovine Oocytes Matured in Vitro with Antioxidants: Impact on the Lipid Content of Oocytes and Early Embryo Development. *Theriogenology* 2020, 146, 152–161, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.028.

32. Abe, T.; Kawahara-Miki, R.; Hara, T.; Noguchi, T.; Hayashi, T.; Shirasuna, K.; Kuwayama, T.; Iwata, H. Modification of Mitochondrial Function, Cytoplasmic Lipid Content and Cryosensitivity of Bovine Embryos by Resveratrol. *J Reprod Dev* 2017, 63, 455–461, doi:10.1262/jrd.2016-182.
33. Zarezadeh, R.; Mehdizadeh, A.; Leroy, J.L.M.R.; Nouri, M.; Fayezi, S.; Darabi, M. Action Mechanisms of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Oocyte Maturation and Developmental Competence: Potential Advantages and Disadvantages. *J Cell Physiol* 2019, 234, 1016–1029, doi:10.1002/jcp.27101.
34. Ortega, M.S.; Kelleher, A.M.; O’Neil, E.; Benne, J.; Cecil, R.; Spencer, T.E. NANOG Is Required to Form the Epiblast and Maintain Pluripotency in the Bovine Embryo. *Mol Reprod Dev* 2020, 87, 152–160, doi:10.1002/mrd.23304.
35. Valckx, S.D.M.; Arias-Alvarez, M.; De Pauw, I.; Fievez, V.; Vlaeminck, B.; Fransen, E.; Bols, P.E.J.; Leroy, J.L.M.R. Fatty Acid Composition of the Follicular Fluid of Normal Weight, Overweight and Obese Women Undergoing Assisted Reproductive Treatment: A Descriptive Cross-Sectional Study. *Reprod Biol Endocrinol* 2014, 12, 13, doi:10.1186/1477-7827-12-13.
36. Dunning, K.R.; Anastasi, M.R.; Zhang, V.J.; Russell, D.L.; Robker, R.L. Regulation of Fatty Acid Oxidation in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes during Maturation and Modulation by PPAR Agonists. *PLoS One* 2014, 9, e87327, doi:10.1371/journal.pone.0087327.
37. Maillard, V.; Desmarchais, A.; Durcin, M.; Uzbekova, S.; Elis, S. Docosahexaenoic Acid (DHA) Effects on Proliferation and Steroidogenesis of Bovine Granulosa Cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018, 16, 40, doi:10.1186/s12958-018-0357-7.
38. Janani, C.; Ranjitha Kumari, B.D. PPAR Gamma Gene--a Review. *Diabetes Metab Syndr* 2015, 9, 46–50, doi:10.1016/j.dsx.2014.09.015.
39. Zarezadeh, R.; Mehdizadeh, A.; Leroy, J.L.M.R.; Nouri, M.; Fayezi, S.; Darabi, M. Action Mechanisms of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Oocyte Maturation and Developmental Competence: Potential Advantages and Disadvantages. *J. Cell. Physiol.* 2019, 234, 1016–1029, doi:10.1002/jcp.27101.
40. Al Darwich, A.; Perreau, C.; Petit, M.H.; Papillier, P.; Dupont, J.; Guillaume, D.; Mermillod, P.; Guignot, F. Effect of PUFA on Embryo Cryoresistance, Gene Expression and AMPKalpha Phosphorylation in IVF-Derived Bovine Embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010, 93, 30–36, doi:10.1016/j.prostaglandins.2010.06.002.
41. Lin, T.; Lee, J.E.; Oqani, R.K.; Kim, S.Y.; Cho, E.S.; Jeong, Y.D.; Baek, J.J.; Jin, D.I. Delayed Blastocyst Formation or an Extra Day Culture Increases Apoptosis in Pig Blastocysts. *Animal Reproduction Science* 2017, 185, 128–139, doi:10.1016/j.anireprosci.2017.08.012.
42. Van Soom, A.; Boerjan, M.L.; Bols, P.E.; Vanroose, G.; Lein, A.; Coryn, M.; de Kruif, A. Timing of Compaction and Inner Cell Allocation in Bovine Embryos Produced in Vivo after Superovulation. *Biol Reprod* 1997, 57, 1041–1049, doi:10.1095/biolreprod57.5.1041.
43. Han, Y.M.; Yamashina, H.; Koyama, N.; Lee, K.K.; Fukui, Y. Effects of Quality and Developmental Stage on the Survival of IVF-Derived Bovine Blastocysts Cultured in Vitro after Freezing and Thawing. *Theriogenology* 1994, 42, 645–654, doi:10.1016/0093-691x(94)90381-r.
44. Han, Y.M.; Yamashina, H.; Koyama, N.; Lee, K.K.; Fukui, Y. Effects of Quality and Developmental Stage on the Survival of IVF-Derived Bovine Blastocysts Cultured in Vitro after Freezing and Thawing. *Theriogenology* 1994, 42, 645–654, doi:10.1016/0093-691X(94)90381-R.
45. Ramos-Ibeas, P.; Gimeno, I.; Cañón-Beltrán, K.; Gutiérrez-Adán, A.; Rizos, D.; Gómez, E. Senescence and Apoptosis During in Vitro Embryo Development in a Bovine Model. *Front Cell Dev Biol* 2020, 8, 619902, doi:10.3389/fcell.2020.619902.
46. Khan, D.; Dubé, D.; Peynot, N.; Ruffini, S.; Laffont, L.; Le Bourhis, D.; Degrelle, S.; Jouneau, A.; Duranthon, V. Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. - PubMed - NCBI Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=laurence+gall+OCT4> (accessed on 22 January 2020).

47. Velásquez, A.E.; Veraguas, D.; Cabezas, J.; Manríquez, J.; Castro, F.O.; Rodríguez-Alvarez, L.L. The Expression Level of SOX2 at the Blastocyst Stage Regulates the Developmental Capacity of Bovine Embryos up to Day-13 of in Vitro Culture. *Zygote* 2019, 27, 398–404, doi:10.1017/S0967199419000509.
48. Ynsaurralde-Rivolta, A.E.; Suvá, M.; Luchetti, C.G.; Bevacqua, R.J.; Munilla, S.; Rodriguez-Alvarez, L.; Velasquez, A.; Briski, O.; Lombardo, D.; Salamone, D. DMSO Supplementation during in Vitro Maturation of Bovine Oocytes Improves Blastocyst Rate and Quality. *Theriogenology* 2020, 148, 140–148, doi:10.1016/j.theriogenology.2020.02.045.
49. Ramos-Ibeas, P.; Nichols, J.; Alberio, R. States and Origins of Mammalian Embryonic Pluripotency In Vivo and in a Dish. *Curr Top Dev Biol* 2018, 128, 151–179, doi:10.1016/bs.ctdb.2017.11.002.
50. Machado, G.M.; Ferreira, A.R.; Pivato, I.; Fidelis, A.; Spricigo, J.F.; Paulini, F.; Lucci, C.M.; Franco, M.M.; Dode, M.A. Post-Hatching Development of in Vitro Bovine Embryos from Day 7 to 14 in Vivo versus in Vitro. *Mol Reprod Dev* 2013, 80, 936–947, doi:10.1002/mrd.22230.
51. Brandão, D.O.; Maddox-Hyttel, P.; Løvendahl, P.; Rumpf, R.; Stringfellow, D.; Callesen, H. Post Hatching Development: A Novel System for Extended in Vitro Culture of Bovine Embryos. *Biol Reprod* 2004, 71, 2048–2055, doi:10.1095/biolreprod.103.025916.
52. Khurana, N.K.; Niemann, H. Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived in Vitro or in Vivo. *Biol. Reprod.* 2000, 62, 847–856.
53. Lane, M.; Gardner, D.K. Lactate Regulates Pyruvate Uptake and Metabolism in the Preimplantation Mouse Embryo. *Biol Reprod* 2000, 62, 16–22, doi:10.1095/biolreprod62.1.16.
54. Bruyère, P.; Baudot, A.; Guyader-Joly, C.; Guérin, P.; Louis, G.; Buff, S. Improved Cryopreservation of in Vitro-Produced Bovine Embryos Using a Chemically Defined Freezing Medium. *Theriogenology* 2012, 78, 1294–1302, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.025.
55. Ynsaurralde-Rivolta, A.E.; Suvá, M.; Luchetti, C.G.; Bevacqua, R.J.; Munilla, S.; Rodriguez-Alvarez, L.; Velasquez, A.; Briski, O.; Lombardo, D.; Salamone, D. DMSO Supplementation during in Vitro Maturation of Bovine Oocytes Improves Blastocyst Rate and Quality. *Theriogenology* 2020, 148, 140–148, doi:10.1016/j.theriogenology.2020.02.045.
56. Yi, J.-K.; Park, S.; Ha, J.-J.; Kim, D.-H.; Huang, H.; Park, S.-J.; Lee, M.-H.; Ryoo, Z.-Y.; Kim, S.-H.; Kim, M.-O. Effects of Dimethyl Sulfoxide on the Pluripotency and Differentiation Capacity of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cellular Reprogramming* 2020, 22, 244–253, doi:10.1089/cell.2020.0006.
57. Kang, M.-H.; Das, J.; Gurunathan, S.; Park, H.-W.; Song, H.; Park, C.; Kim, J.-H. The Cytotoxic Effects of Dimethyl Sulfoxide in Mouse Preimplantation Embryos: A Mechanistic Study. *Theranostics* 2017, 7, 4735–4752, doi:10.7150/thno.21662.
58. Stöhr, J.; Grothmann, H.; Wrenzycki, C.; Stöhr, J.; Grothmann, H.; Wrenzycki, C. 55 Effect of Dimethyl Sulfoxide Supplementation on Bovine in Vitro Embryo Development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2016, 28, 157–158, doi:10.1071/RDv28n2Ab55.
59. Konishi, M.; Aoyagi, Y.; Takedomi, T.; Itakura, H.; Itoh, T.; Yazawa, S. Presence of Granulosa Cells during Oocyte Maturation Improved in Vitro Development of IVM-IVF Bovine Oocytes That Were Collected by Ultrasound-Guided Transvaginal Aspiration. *Theriogenology* 1996, 45, 573–581, doi:10.1016/0093-691x(95)00404-v.
60. Janati Idrissi, S.; Le Bourhis, D.; Lefevre, A.; Emond, P.; Le Berre, L.; Desnoës, O.; Joly, T.; Buff, S.; Maillard, V.; Schibler, L.; et al. Lipid Profile of Bovine Grade-1 Blastocysts Produced Either in Vivo or in Vitro before and after Slow Freezing Process. *Sci Rep* 2021, 11, 11618, doi:10.1038/s41598-021-90870-8.
61. Holm, P.; Booth, P.J.; Schmidt, M.H.; Greve, T.; Callesen, H. High Bovine Blastocyst Development in a Static in Vitro Production System Using SOFaa Medium Supplemented with Sodium Citrate and Myo-Inositol with or without Serum-Proteins. *Theriogenology* 1999, 52, 683–700, doi:10.1016/S0093-691X(99)00162-4.
62. Van Soom, A.; Ysebaert, M.T.; de Kruif, A. Relationship between Timing of Development, Morula Morphology, and Cell Allocation to Inner Cell Mass and Trophectoderm in in Vitro-Produced Bovine Embryos. *Mol Reprod Dev* 1997, 47, 47–56, doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q.

Conclusions et perspectives

La modulation du profil lipidique par l'alimentation de la donneuse ne permettant pas de modifier le profil lipidique des embryons produits par OPU-FIV, l'ajout d'un acide gras de type oméga-3 (DHA) directement dans les milieux de maturation des ovocytes et de culture des embryons a été testé. Etant donné que le DHA est solubilisé dans du DMSO et ajouté en présence d'antioxydant (carnosine), c'est la combinaison de l'ensemble de ces molécules qui a été évaluée. Il a été démontré précédemment que l'ajout d'oméga 3 dans l'alimentation des femelles donneuses n'entraînait aucun changement dans le profil lipidique des embryons produit par OPU-FIV mais impactait l'efficacité de la production d'embryons en augmentant le nombre de COCs ponctionnées, en modulant le profil lipidique ovocytaire ainsi qu'en améliorant les taux de blastocystes de bonne qualité (Q1+Q2). Compte-tenu de ces résultats, l'hypothèse initiale consistait à obtenir, par la supplémentation des milieux en oméga 3, une augmentation du taux de blastocystes de bonne qualité sans que le profil lipidique des embryons ne soit impacté. L'ajout de DHA dans le milieu de maturation n'a pas permis une augmentation du taux de blastocystes de qualité 1 sans que le profil des embryons produits n'ait pu être étudié. En effet, il a été mis en évidence que l'ajout de 20 μ M de DHA dans le milieu de maturation des ovocytes bovins n'a aucun effet sur le développement embryonnaire, ni sur la survie post décongélation, ni sur le nombre total de cellules et le nombre de cellules pluripotentes (SOX2). L'ajout de 20 μ M de DHA dans le milieu de maturation des ovocytes a permis une diminution du ratio de cellules SOX2/ cellules totales en comparaison au contrôle non supplémenté (8,4% vs. 13,7%). Cette diminution pourrait être expliquée par, l'augmentation (non significative) du nombre moyen de cellule totale par embryon lorsque les ovocytes sont supplémentés en DHA. Cette concentration a été retenue et son ajout dans le milieu de maturation des ovocytes et/ou de culture des embryons a été testé. Le groupe permettant l'obtention des meilleurs résultats est celui supplémenté en DHA uniquement dans le milieu de développement embryonnaire. Ce groupe a permis d'obtenir des taux de développement, de cryosurvie ainsi qu'un nombre de cellules totales et SOX2 positives similaires au contrôle. Le ratio cellules SOX2/ cellules totales étaient cependant diminué. Il est possible que la diminution du nombre de cellules SOX2 soit suffisante, bien que non significative, pour expliquer la diminution du ratio. Etonnamment, l'ajout de DHA uniquement dans le milieu de maturation, a entraîné cette fois, une diminution du taux de blastocyste Q1 à J8 ce qui n'était pas le cas de la première expérience. Ces différences sont probablement dues aux effectifs qui étaient bien plus

importants lors de la première expérience (773 vs. 482), et au fait que l'effet que l'on souhaite mesurer est minime ou inexistant par rapport à la variabilité expérimentale qui est importante. Qu'importe le lot, les taux de cryosurvie et le nombre total de cellules et de cellules SOX2 n'ont pas été impactés. Cependant, congeler les blastocystes Q1 à J8 n'est pas bénéfique à la reprise du développement post décongélation. En effet les BE Q1 congelés à J7 présentaient un nombre total de cellules et de cellules SOX2 supérieur, 48h après décongélation, en comparaison à ceux congelés à J8. L'avantage d'ajouter du DHA dans le milieu de développement des embryons était l'augmentation de 12% du taux d'embryons avec du marquage SOX2 et donc des cellules pluripotentes en comparaison du témoin. Analyser le profil lipidique par spectrométrie de masse permettrait d'évaluer si le DHA module le profil lipidique et pourrait participer à l'explication des résultats que l'on obtient. La réalisation de transferts embryonnaires pour ces différents lots expérimentaux pourrait être une option intéressante pour vérifier si l'augmentation de 12% du taux d'embryons avec du marquage SOX2 conduit à une amélioration des taux de gestation. La difficulté majeure serait d'avoir suffisamment de puissance statistique pour mettre en évidence une différence de 12%. En effet, il faudrait au minimum 130 embryons par groupe expérimental, soient plus de 1000 COCs en fécondation *in vitro* ce qui semble difficilement réalisable dans le temps imparti pour ces travaux de thèse et même en dehors.

Comme démontré précédemment, le protocole de congélation lente impacte le profil lipidique des embryons en partie en détruisant les LPC. Bien que le protocole de congélation lente le plus couramment utilisé pour la congélation d'embryons bovins, à base d'éthylène glycol et de sucrose, permet une meilleure préservation des GP et des lysophospholipides (LPL), il contient des dérivés de produits animaux, dont la composition variable et non définie peut conduire à des résultats différents en fonction des lots et dont l'origine biologique n'assure pas une garantie sanitaire absolue. De plus, la cryopréservation des embryons bovins PIV biopsiés n'est aujourd'hui pas optimale et ne permet pas l'obtention de taux de gestation suffisamment élevés pour une utilisation en routine. L'enjeu actuel consiste donc à remplacer ces dérivés par des composés synthétiques de composition chimiquement définie et permettant l'obtention de résultats similaires ou supérieurs à ceux obtenus avec les protocoles utilisés couramment. C'est pourquoi, dans l'étude suivante, deux concentrations de CRYO3 ont été testées (20 et 100%) en congélation lente et en vitrification sur embryons entiers et biopsiés.

6. Article 4. Benefit of CRYO3 on cryosurvival of in vitro produced bovine embryos, non-biopsied or biopsied, and slow frozen or vitrified

Sarah Janati Idrissi ^{1,3*}, Daniel Le Bourhis ¹, Laurene Le Berre ¹, Laurent Schibler ¹, Pascal Salvetti ¹, Anne Baudot ², Gérard Louis ², Thierry Joly ^{3,4}, Samuel Buff ³

1 Alice, 37380 Nouzilly, France;

2 Université de Paris, Université Descartes Paris V, LVTS, Inserm UMRS 1148, F-75018 Paris, France

3 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA-Lyon, UPSP ICE 2021.A104, F-69007 Lyon, France

4 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, VetAgro Sup, UPSP ICE 2021.A104, F-69280 Marcy l'Etoile, France;

* Correspondance: sarah.janati.idrissi@gmail.com

Abstract

This study evaluates the interest of CRYO3 (Stem Alpha, France) for replacing the animal-derived products in bovine embryos cryopreservation media. During the experiment, commonly used media added containing 0.4g/L BSA was used as reference. The CRYO3 was used in slow freezing and vitrification media at 20 or 100% and was used for the cryopreservation of non-biopsied, biopsied/collapsed, and biopsied/re-expanded bovine embryos. The results allow to highlight that for slow freezing protocol, solution at 20% CRYO3 was more suitable for cryopreservation of bovine embryos regardless they were non-biopsied, biopsied/collapsed, and biopsied/re-expanded. Vitrification with 20% CRYO3, was deleterious to the cryosurvival of non-biopsied embryos, the cryosurvival rate 48h after warming was decreased in comparison with the slow freezing control, respectively, 28.3%, vs. 66.4%. Only 100% CRYO3 allow to obtain a vitrification survival rate not significantly different from the control although a decrease was observed (42.4% vs. 66.4%) and was the concentration used for the biopsy experiment. When embryos were biopsied the cryosurvival rate of vitrified embryos have been doubled (42.4% vs. 96.3%). Moreover, it seems that re-expansion after biopsy was not suitable for vitrification of bovine embryo and better cryosurvival rate was obtained when the vitrification occurred just after the biopsy when embryos were collapsed, (96.3% vs. 73.8%). In conclusion, the use of CRYO3 to replaced animal-derived products in cryopreservation medium seems to be an interesting alternative to the conventional medium containing SVF or BSA. In this study we have demonstrated that 20% of CRYO3 in slow freezing medium was suitable for the cryopreservation of bovine embryos regardless they were non-biopsied, biopsied/collapse, or biopsied/re-expanded. We also demonstrated that 100% of CRYO3 was deleterious to the cryosurvival of bovine non-biopsied embryos but was totally suitable for vitrification of biopsied/collapsed embryos and allow high cryosurvival rate.

Introduction

Over the past decade, OPU-IVF have become increasingly common techniques in the cattle breeding industry for the commercial breeding of elite animal worldwide. *In vitro* embryo technology has great potential for enhancing genetic selection, improving fertility, and allowing the production of “value-added” embryos with gender selection or detection of specific gene alleles. Cryopreservation of embryos is essential in assisted reproductive technology, especially when the embryos genotyped and transferred to recipient female. It allows embryos storage and facilitates their transport. Two procedures are used for the cryopreservation of the bovine embryos : vitrification/warming (V/W) and freezing/thawing (F/T). One of the limitations of OPU-IVF is that the *in vitro* production conditions are suboptimal and globally alter the developmental competence of the embryos : while the pregnancy rates reach 50% for *in vivo* produced, biopsied and frozen embryos ¹, the pregnancy rate of *in vitro* produced, biopsied and frozen embryos with the current freezing method only leads to pregnancy in less than 30% of cases ², thus limiting the interest of this technique. Therefore, improving cryosurvival after V/W and F/T is a key issue in cattle embryo biotechnology.

Most commercially available bovine embryo handling, storage and cryopreservation media contain derived animal products such as FCS or BSA ³⁻⁵. Even though the mechanisms by which SVF or BSA affect embryos are not fully understood, the presence of these products is known to be correlate with an increase in embryo lipid content, resulting in cryosensitivity and apoptosis ^{6,7}. The presence of these product in embryo cryopreservation media is linked to their surfactant and antioxidant properties. In fact, added to the freezing/vitrification media they would facilitate the handling of embryos by reducing the surface tension of the medium and would be chelators of heavy metals ⁴. Despite their advantages, their composition is variable and undefined and can lead to different results depending on the batches. In addition, their biological origin does not provide an absolute sanitary guarantee ⁸. The current challenge is to replace these derivatives with synthetic compounds of chemically defined composition. When ruminant embryos were exposed to serum or BSA before transfer the incidence of large offspring syndrome appears to be significantly higher than when embryos were *in vivo* produced or produced in oviduct $p < 0.05$ ^{9,10}. Due to their origins it is possible that these derived animal products are contaminated by viruses and that the recommendations, such as washing the embryos with trypsin baths, are not sufficient to avoid all contaminations ⁸.

Various synthetic compounds have been studied to replace the animal derived compounds, such as CRYO3, a patented medium without serum, protein, and dextran. The CRYO3 added up to 20% in the slow freezing medium of bovine embryos, would increase the rates of cryosurvival compared to freezing solution containing BSA or FCS, respectively, 81.5 vs. 42.2 and 58.0%, and the hatching rate, respectively, 61.1 vs. 31.1 and 36.0%, post thawing, $p < 0.05$ ¹¹. Using CRYO3 in vitrification on rabbit

embryos at 20% would make it possible to obtain results similar to those obtained with 0.4g/L of BSA instead of CRYO3, suggesting that CRYO3 would replace derived animal product in vitrification media¹². Used in slow freezing or in vitrification, up to 20%, on bovine embryos which have been cultured in the absence of proteins over the last 24h of culture, would make it possible to obtain gestation rates at 62 days like those obtained with fresh embryos (59%)¹³. The use of CRYO3 for the cryopreservation of rabbit IPS, has shown its effectiveness, in making possible to replace foetal calf serum and reduced the DMSO concentration, in slow freezing protocol. Thereby, in slow freezing, the synthetic CRYO3 medium supplemented with 4% DMSO would replace the traditional freezing medium composed of FCS and 10% DMSO, for the cryopreservation of skin tissues and rabbit induced pluripotent stem cells¹⁴. Regarding the preservation of ram sperm, the results are less obvious. CRYO3 does not allow the preservation of the integrity of the plasma membrane and the acrosome as well as the mitochondrial membrane potential, although pregnancy rate are not significantly different from those obtained with the medium containing animal derived products, respectively, 67.3 vs. 72.2%¹⁵.

In addition to making it possible to obtain cryosurvival results, similar or superior to those obtained with a cryopreservation medium containing animal-derived products, CRYO3 would have a thermodynamic behaviour similar to solutions containing FCS or BSA¹¹.

Therefore, the CRYO3 seems to be an ideal candidate for the cryopreservation of bovine embryo. The following study was conducted to assess the effects of CRYO3 in cryopreservation solution used for IVP bovine embryos, non-biopsied and biopsied, in slow freezing or in vitrification.

Methods

No experiments with living animals were performed. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), unless otherwise stated in the text.

***In vitro* embryo production**

COCs were retrieved from bovine ovaries collected at a local slaughterhouse. Follicles from 2 to 8 mm in diameter were punctured and rinsed in flushing media (Euroflush, IMV Technologies, France). The *in vitro* embryo production (maturation, fertilisation, and development) was realised as previously described by¹⁶. Briefly, grade-1 COCs¹⁷ were selected and rinsed in flushing media (Euroflush, IMV Technologies, France) before being *in vitro* matured in a medium which consisted in TCM-199, supplemented with 10% FCS (v/v), 10 µg/mL pFSH/pLH, 1 µg/mL 17β-estradiol, 5 ng/mL epidermal growth factor and 5 µg/mL gentamicin.

Eighteen hours after fertilisation all presumptive zygotes were cleared of cumulus cells and spermatozoa attached to the zona pellucida by vortex. Zygotes were washed twice in Euroflush then twice in *in vitro* development medium (IVD). Zygotes were cultured in 30 µL micro drop of IVD at 38.5°C in a maximal humidified atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ and covered with mineral oil (Liquid Paraffin, Origio, Måløv, Denmark). *In vitro* development medium consisted of synthetic oviductal fluid (SOF, Minitub, GmbH, Germany) supplemented with 1% of oestrus cow serum, 2% MEM 100x, 1% BME 50x, 0.33g/L Na-pyruvate and 6 g/L fatty-acid-free BSA at 38.5°C, in a maximal humidified atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂.

In vitro development was recorded like described by ¹⁸. Briefly, cleavage rates were assessed 48h post-fertilisation (D2). Total development rate at D6 was evaluated by considering the structures developed from morula to blastocyst stage. Blastocyst development rates and embryo quality were recorded on Days 6 to 8 (Day 0 = day of IVF), according to the I.E.T.S morphological criteria (Chapter 9 and Annex D, IETS Manual, 3rd edition).

Embryo cryopreservation

For cryopreservation, only grade-1 expanded blastocysts were used for the experiment, i.e., expanded blastocysts with compact inner cell mass, uniformly coloured blastomeres, few irregularities or excluded cells and an intact and smooth zona pellucida.

For slow freezing procedure, embryos were washed in embryo holding medium (EHM, IMV Technologies, France) and slow frozen like described by ¹⁸. Embryos equilibrated in freezing solution consisted of 1.5 M ethylene glycol embryo freezing medium (ET freezing media, IMV, Technologies, France) with 0.1 M sucrose added for 10 min at room temperature. During the equilibration period, groups of embryos (maximum 10) were loaded into 250µL straws. At the end of the equilibration period, straws were placed in the cryochamber of the freezer (Freeze Control, Cryologic, Australia), previously equilibrated at - 6 °C. After 2 min, the seeding was manually induced with supercooled scissors. The temperature was stabilised at - 6 °C for 8 min post-seeding and then straws were cooled to -32 °C at a constant rate of 0.3 °C/min. At the end of the program, straws were plunged into liquid nitrogen and stored for at least one week. Two CRYO3 concentration, 20 and 100%, were tested and compared to the current used commercial solution. All slow freezing solution containing 1.5M EG and 0.1M sucrose as cryoprotectants. The different slow freezing solutions tested were as follows :

- **Control** : Commercial solution containing 1.5 M EG + 0.1 M sucrose + 4 g/L BSA (ET freezing media, IMV, Technologies, France)

- **SF1** : 20% CRYO3 diluted in D-PBS (v/v) + 1.5 M EG + 0.1 M sucrose ¹¹
- **SF2** : 100% CRYO3 + 1.5 M EG + 0.1 M sucrose

For vitrification procedure, embryos were vitrified using a Cryologic Vitrification Method (CVM). Embryos were equilibrated within 3 minutes in equilibration solution (ES), and then were plunged in vitrification solution VS for 30 s. During this time, the embryos were expelled into a droplet which is transferred to the hook of Fiberplug (CVM Fiberplugs with Sleeves, Cryologic, Australia) and then vitrified by contact of the fiberplug with a previously supercooled iron support (CVM Vitrification Block, Cryologic, Australia) in a cryobath containing liquid nitrogen (CVM CryoBath, Cryologic, Australia). The droplet was rapidly vitrified into a glassy bead. Like slow freezing protocol, two concentrations of CRYO3 (20 and 100%) were assessed and compared to the slow freezing current used commercial solution. All vitrification solutions containing 15% DMSO, 15% EG and 0.5M sucrose as cryoprotectants. The equilibration and vitrification solution were as follow :

- ES1: 20% CRYO3 diluted in D-PBS + 7,5% DMSO + 7,5% EG
- ES2: 100% CRYO3 + 7,5% DMSO + 7,5% EG
- VS1: 20% CRYO3 diluted in D-PBS + 15% DMSO + 15% EG + 0,5M Sucrose
- VS2: 100% CRYO3 + 15% DMSO + 15% EG + 0,5M Sucrose

Thawing and assessment of *in vitro* cryosurvival of cryopreserved embryos

For thawing, slow frozen straws were kept 3 s in ambient air and plunged in a water bath at 35°C for 30 s. Their contents were expelled into Petri dish. After 15 min of rehydration at room temperature, the embryos were washed for 5 min in EHM still at room temperature.

For devitrification, embryos were directly plunged into a warming solution consisted of EHM added with 0.25 M sucrose, for 5 min, and then were washed 3 time in EHM solution.

Finally, the embryos were washed and cultured in SOF, with the same composition as that used for IVD, for 48h in a maximal humidified atmosphere of 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *In vitro* viability was assessed by the ability of thawed embryos to re-expand after 24 and 48h (survival rate) and to hatched after 48h (hatching rate).

SOX2 Immunostaining

To assess whether the different cryopreservation protocols had an impact on the ICM cells, SOX2 immunostaining (pluripotency marker) was performed. Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde phosphate buffered saline (PBS) solution for 15 min. The blastocysts were then washed in a solution of TCM199 HEPES, supplemented with 0.1% Tritonx100 and 2% FCS, for twice 5 min. Embryos were permeabilised in PBS, 0.5% Tritonx100, 1% BSA and 10% FCS, for 1 h at 37°C. Embryos were incubated with the primary antibody, goat anti-SOX2 polyclonal antibody (R&D System, USA, at 1/250 in a PBS solution, supplemented with 0.1% Tritonx100 and 1% BSA for 1 h at 37°C. The embryos were then washed for 45 min in the washing solution at room temperature. Then, they were incubated with the polyclonal secondary antibody, an anti-goat IgG secondary antibody conjugated to indocarbocyanine Cy3 (805-165-180, Jackson ImmunoResearch, USA), diluted at 1/1500 in a solution of PBS, 0.1% triton and 1% BSA for 1h at 37°C. After 45 min of washes, the nuclei of the embryos were counter-labelled with Hoechst 33342 (5µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, France) for 6 min at 37°C. After rinsing, the embryos were mounted between slides and coverslips in mounting medium (Fluoromount-G™, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, France).

Confocal microscope and image processing

Observation of fluorescent markers was performed with a confocal laser scanning microscope (LSM700, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Munich, Germany) This microscope is driven by Zen black acquisition software (release 2009, ZEISS). The acquisition parameters were as follows: Objectives 20x0.8; Gain between 700 and 800 depending on the channel; Laser power between 0.8 and 4%; Excitation of Cy3 at 555 nm and Hoechst 33342 at 405 nm; Optimal resolution of 2048 * 2048 pixels/image; Scanner speed at 7 (scanning time 0.79 µs/pixel, or 23.23 s/image); Acquisition interval of 1 µm for z-images.

The acquisition of z-images of SOX2 and Hoechst immunofluorescence was performed by "Z-stack" using Zen black software. "Z-stack" it is a process of compiling several images with varying focal planes, to produce an image with a greater depth of field. In order to exploit and extract the information concerning the number of cells, the following image treatments have been applied: "Maximum intensity projection" which allows to project the pixel with the highest value on the z axis so that in a single two-dimensional image all the dense structures of a given volume are observed, and "Filter median" in order to reduce the noise of the image. Cell counting was then performed with Fiji software (Image J, release 2.3.0.), using the "Multi-point Tool" which allows manual counting.

Statistical analysis

Data analysis was performed under SAS (Statistical Analysis Software release 9.4). For the analysis of qualitative data, multivariate analysis was performed using a logistic regression mixed models with post hoc Tukey-Kramer correction (GLIMMIX procedure), including for the analysis the fixed effect of the experimental condition, of the biopsy, and of the interaction of these effects. For the analysis of quantitative data MIXED procedure was performed with post hoc Tukey-Kramer correction with fixed effect of the experimental condition, of the biopsy, and of the interaction of these effects. Unlike the p values of the effects (groups, biopsy, and groups*biopsy) which were not adjusted, the comparisons within the effects comparisons were carried out with the adjusted p value.

Experimental design

Experiment 1. Evolution of SOX2 immunostaining on fresh embryos between D7 and D9 of development and impact of the biopsy

To determine how SOX2 staining evolves between D7 and D9 (D7 + 48h of culture period) a preliminary study was necessary. To do this, expanded grade-1 fresh blastocysts were selected on D7. Half of them were biopsied and put back in culture over 48h, the other half were not biopsied and just put into culture over 48h. This culture phase made it possible to mimic the cryosurvival period after thawing or warming. Results were presented in Table 1.

Experiment 2. Effect of CRYO3 on cryopreservation of the non-biopsied bovine IVP grade-1 expanded blastocysts, in slow freezing or vitrification protocols

To determine if the CRYO3 compound at different concentrations (20 and 100%) allow better results than the control slow freezing protocol, non-biopsied embryos were slow frozen or vitrified with the solution previously described : Control, SF1, SF2, VS1 and VS2 (Figure 1.). Due to the sensitivity of the IVP biopsied grade-1 expanded blastocysts and the heaviness of the biopsy protocol, the hypothesis that a protocol that will be harmful for non-biopsied embryos will be more harmful for biopsied embryos has been formulated. After 48h of culture after thawing, Hoechst and SOX2 immunostaining were performed on re-expanded embryos to quantify the total cell number and the number of pluripotent cells. Results were presented in Table 2 and Table 3.

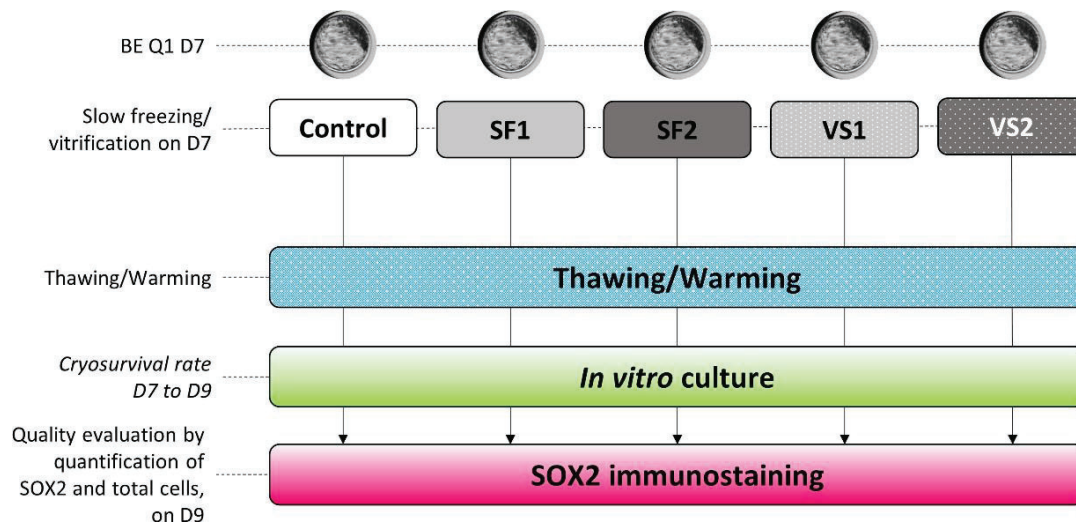


Figure 1. Experimental design of experiment 2. *In vitro* produced grade-1 blastocyst were slow frozen or vitrified according to different protocols. After thawing, embryos were *in vitro* cultured during 48h to assess the re-expansion and the hatching rate. After 48h of cryosurvival, Hoechst and SOX2 immunostaining were realised to quantify the total cell number and the number of pluripotent cells.

Experiment 3. Effect of CRYO3 on cryopreservation of IVP grade-1 expanded blastocysts directly after the biopsy (+) or following a 2h culture period after the biopsy (+2h), , in slow freezing and vitrification protocols

The biopsy of the IVP grade-1 expanded blastocysts induces a collapse of the blastocoele and the opening of the zona pellucida. The recultivation during 2h of biopsied expanded blastocysts allowed to reform the blastocoele cavity, potential ice crystals reservoir. In this way, the solutions which allowed to obtain the best results on non-biopsied embryos (experience 1) were tested on biopsied (+) and biopsied and recultured (+2h) embryos to verify whether the presence or absence of the blastocoele affect the cryosurvival and the allocation of cells of IVP grade-1 expanded blastocysts. Results were presented in Table 4 and Table 5 and were compared to non-biopsied embryos (-).

Results

Experiment 1

Unsurprisingly, by comparing D7 non biopsied and D9 non biopsied groups, a strong effect of the 48h of culture period was observed. Indeed, the 48h of culture between D7 and D9 of development allowed a strong proliferation of the trophectoderm (158.3 vs. 301.8, p adjusted < 0.0001) and a decrease in the number of cells expressing SOX2 (70.4 vs. 37.2, p adjusted = 0.009) was observed (Table 1). In this way, between D7 and D9 the ratio SOX2 / total cells had decreased (41.0% vs. 12.6%, p adjusted < 0.0001) (Table 1).

By comparing D9 non biopsied and D9 biopsied groups, no effect of the biopsy was observed on the number of total and SOX2 cells. However, it seems that the biopsy induced a trophectoderm proliferation (301.8 vs. 357.7, p adjusted = 0.031). This experiment allowed to know the evolution of SOX2 from D7 to D9. We therefore expect to obtain after cryosurvival evaluation, embryos with a high total cell number and a ratio SOX2 / total cell of around 13%.

Table 1. SOX2 staining evolution between D7 and D9 of development of blastocysts grade-1, biopsied or non-biopsied.

Groups	n	Embryos with SOX2 (%LSmean ± sem)	Cells number (LSmean ± sem)		Ratio (%LSmean ± sem)
			Total cells	SOX2 cells	SOX2 / total cell
D7 non biopsied	19	100	158.3 ± 22.4 ^b	70.4 ± 10.3 ^a	41.0 ± 0.9 ^a
D9 non biopsied	29	86.2 ± 6.4	301.8 ± 19.5 ^a	37.2 ± 8.9 ^b	12.6 ± 0.4 ^c
D9 biopsied	21	95.2 ± 4.6	357.7 ± 21.8 ^a	54.3 ± 9.8 ^{a,b}	14.1 ± 0.4 ^b
<i>p value groups</i>		0.6312	< 0.0001	0.0093	<0.0001

LSmean ± sem were represented in the **Table 1**. Different superscripts within a column represent significant differences (p adjusted < 0.05). LSmean ± sem = Least-square means ± standard error of means.

Experiment 2

Regarding the survival rate after 24 and 48h, there was a group effect, respectively $p = 0.0002$ and 0.0001 . In fact, whatever the concentration of CRYO3 (VS1 and VS2), the vitrification was harmful to the cryosurvival of the embryos in comparison with the control, respectively 50.3% (p adjusted = 0.0055)

and 42.3% ($p_{adjusted} = 0.0018$) vs. 91.1%. Regarding the survival rate after 48h of slow frozen embryos, no significant differences were observed between the two concentrations of CRYO3 (SF1 and SF2) and the control, respectively 93.1% and 80.9% vs. 91.1% (Table 2).

Regarding the hatching rate, there was also a group effect, ($p = 0.0016$). There was a significant diminution of the hatching rate for embryos vitrified with VS1 in comparison to the control, respectively, 28.3% vs. 66.4%, $p_{adjusted} = 0.0262$. For slow frozen embryos there was no differences in the hatching rate, the group giving the highest results was the one where the slow freezing solution was added with 20% of CRYO3 (Table 2).

Table 2. Embryo re-expansion and hatching rates after *in vitro* culture of frozen/thawed or vitrified/warmed IVP grade-1 expanded blastocysts, with different concentration of CRYO3.

Groups	n	Re-expansion rate (%LSmean \pm sem)		Hatching rate
		+24h	+48h	(%LSmean \pm sem)
Control	55	84.4 \pm 5.4 ^a	91.1 \pm 4.0 ^a	66.4 \pm 8.7 ^{a,b}
SF1	57	95.1 \pm 2.9 ^a	93.1 \pm 3.4 ^a	79.7 \pm 6.8 ^a
SF2	57	84.9 \pm 5.2 ^a	80.9 \pm 5.6 ^a	69.2 \pm 8.3 ^{a,b}
VS1	38	46.2 \pm 9.6 ^b	50.3 \pm 9.0 ^b	28.3 \pm 9.6 ^c
VS2	36	49.3 \pm 9.8 ^b	42.3 \pm 9.1 ^b	42.4 \pm 11.0 ^{b,c}
<i>p value groups</i>		0.0002	0.0001	0.0016

LSmeans \pm sem were represented in the **Table 2**. Different superscripts within a column represent significant differences ($p_{adjusted} < 0.05$). LSmeans \pm sem = Least-square means \pm standard error of means.

Slow freezing or vitrification protocols did not impact the proportion of embryos expressing SOX2 after 48h of cryosurvival, ($p = 0.11$), but impacted the total cell number ($p = 0.011$) and the ratio SOX2 / total cells ($p < 0.0001$). The SF1 protocol allowed obtaining the highest rate of embryos expressing SOX2 (96.4%). This protocol allowed to obtain embryos with total cell number greater than the control, respectively 195.1 \pm 16.7 vs. 141.9 \pm 16.6 cells, $p_{adjusted} = 0.004$. Conversely, the number of SOX2 cells was not impacted by the freezing protocol ($p = 0.387$). The SOX2 / total cells ratio was decreased for embryos slow frozen with SF1 compared to the control, respectively 11.7 \pm 1.0 vs. 16.6 \pm 1.3, $p_{adjusted} < 0.0001$. This could be explained by the increase in the average number of total cells. Same results were observed for the VS2 group, where the ratio is also reduced, but this time it would rather be explained by the fact that the average number of total cells and SOX2 cells were lower (Table 3).

Table 3. Cells allocation in IVP expanded grade-1 blastocysts after slow freezing or vitrification with different concentrations of CRYO3.

Groups	n	Embryos with SOX2 (%LSmean ± sem)	Cells number (LSmean ± sem)		Ratio
			Total cells	SOX2 cells	(LSmean ± sem)
Control	37	92.1 ± 4.4	141.9 ± 16.6 ^b	23.5 ± 3.4	16.6 ± 1.3 ^b
SF1	40	80.4 ± 5.8	195.1 ± 16.7 ^a	23.0 ± 3.4	11.7 ± 1.0 ^c
SF2	34	96.4 ± 3.5	161.2 ± 18.0 ^{a,b}	31.0 ± 3.9	20.0 ± 1.6 ^a
VS1	12	64.7 ± 11.6	177.8 ± 23.0 ^{a,b}	25.9 ± 5.9	15.7 ± 1.5 ^b
VS2	12	78.6 ± 11.0	175.6 ± 23.3 ^{a,b}	19.2 ± 6.0	11.1 ± 1.1 ^c
<i>p</i> value		0.11	0.011	0.387	<0.0001

LSmeans ± sem were represented in the **Table 3**. Different superscripts within a column represent significant differences (p adjusted < 0.05). LSmeans ± sem = Least-square means ± standard error of means.

Experiment 3

Whatever the nature of the embryos there was an effect of the cryopreservation groups on the re-expansion rate at 24h ($p = 0.0237$) and 48h ($p = 0.039$) post thawing and on the hatching rate ($p = 0.0228$). There was no significant effect of the biopsy on the re-expansion and the hatching rate but there was an interaction between the cryopreservation protocol used and the biopsy on the re-expansion rate at 24h ($p = 0.0323$) and at 48h ($p = 0.0091$). In fact, although no difference was demonstrated between biopsied and whole embryos when the embryos were slow frozen (control and SF1), this was not the case for vitrified embryos. A decrease in the re-expansion rate 48h after thawing (41.8% vs. 91.3%, p adjusted = 0.0048) was observed when non-biopsied embryos (-) were vitrified with VS2 in comparison with the control. The diminution of the re-expansion rate for embryos vitrified with VS2 was only observed when embryos were non biopsied. Once the embryos have been biopsied (+) or biopsied and recultured during 2h (+2h), no difference were observed between vitrified embryos and slow frozen ones (control and SF1) (Table 4).

Table 4. Embryo re-expansion and hatching rates after *in vitro* culture of frozen or vitrified IVP grade-1 expanded blastocysts, non-biopsied (-), biopsied (+), or biopsied and put back in culture for 2H (+2h), with different concentration of CRYO3.

	biopsy	n	Re-expansion rate (%Lsmean \pm sem)		Hatched embryos (%Lsmean \pm sem)
			+24h	+48h	+48h
<i>P value groups</i>			<i>0.0237</i>	<i>0.0039</i>	<i>0.0228</i>
Control		179	90.7 \pm 2.9 ^{a,b}	93.0 \pm 2.5 ^a	65.6 \pm 8.3 ^a
SF1		180	93.2 \pm 2.4 ^a	93.0 \pm 2.5 ^a	79.0 \pm 6.6 ^a
VS2		94	79.9 \pm 5.2 ^b	77.4 \pm 6.2 ^b	42.7 \pm 10.5 ^b
<i>P value biopsy</i>			<i>0.2061</i>	<i>0.2986</i>	-
-		148	81.8 \pm 5.4	82.6 \pm 6.3	63.6 \pm 7.0
+		194	91.0 \pm 3.0	92.4 \pm 3.0	-
+2h		111	92.1 \pm 3.7	91.3 \pm 4.7	-
<i>P value groups*biopsy</i>			<i>0.0323</i>	<i>0.0091</i>	-
Control	-	55	83.9 \pm 6.0 ^{a,b}	91.3 \pm 4.6 ^a	65.6 \pm 8.3 ^{a,b}
Control	+	86	91.0 \pm 3.6 ^a	91.8 \pm 3.7 ^a	-
Control	+ 2h	38	94.6 \pm 4.2 ^{a,b}	95.2 \pm 4.0 ^{a,b}	-
SF1	-	57	94.9 \pm 3.1 ^a	93.4 \pm 3.9 ^a	79.0 \pm 6.6 ^a
SF1	+	83	88.2 \pm 4.2 ^a	89.1 \pm 4.5 ^a	-
SF1	+ 2h	40	94.8 \pm 4.0 ^{a,b}	95.3 \pm 3.9 ^{a,b}	-
VS2	-	36	48.6 \pm 11.0 ^b	41.8 \pm 12.6 ^b	42.7 \pm 10.5 ^b
VS2	+	25	93.1 \pm 4.4 ^{a,b}	95.1 \pm 3.5 ^a	-
VS2	+ 2h	33	83.27 \pm 7.4 ^{a,b}	74.2 \pm 11.0 ^{a,b}	-

LSmeans \pm sem were represented in the **Table 4**. When there was a significant difference in the variable, groups, biopsy, or groups*biopsy, (in grey raw), different superscripts were added in a column representing significant differences (p adjusted < 0.05). LSmeans \pm sem = Least-square means \pm standard error of means.

Experimental groups had no effect on the proportion of embryos showing a SOX2 staining. We only highlighted a tendency to a decrease of this proportion when embryos were vitrified (VS2) in comparison with SF1, respectively 80.4% vs. 93.5%, p adjusted = 0.054 (Table 5). There was no effect of experimental groups and biopsy on the total and SOX2 positive cells. However, there was an impact of these two variables on the ratio of SOX2/Total cells. Indeed, a decrease of the ratio was observed when embryos were slow frozen with SF1 in comparison with the control (12.9% vs. 16.0%, p adjusted

< 0.0001). This decrease was greater when embryos were vitrified (VS2), in comparison with the control, respectively (10.9% vs. 16.0%, *p adjusted* < 0.0001). To understand this ratio, it was necessary to consider the number of total and SOX2 cells. Thus, the higher ratio of the control group could be explained by the average number of total cells which was less important than for the other groups while the number of SOX2 cells was similar (176.1 vs. 195.2 and 192.1).

The biopsy also influenced the ratio SOX2/total cells. Recultured embryos (“+2h” group) resulted in a decreased of the ratio of SOX2/total cells in comparison with biopsied embryos, respectively 12.5% vs. 13.5%, (*p adjusted* = 0.0394). Depending on the slow freezing/vitrification medium, the biopsy did not have the same effect on the ratio of SOX2/Total cells (significant interaction between groups and biopsy effects, *p* < 0.0001). When embryos were biopsied and recultured 2h before slow freezing (control or SF1), the ratio of SOX2/Total cells was decreased and total cells number was higher compared to other conditions, describing embryos more advanced in their development. Conversely, when embryos were vitrified (VS2) the most favourable condition was that where the embryos were vitrified just after biopsy, this condition made it possible to obtain a low ratio of SOX2/Total cells and a high number of total cells, compared to other conditions (Table 5).

Table 5. Cell allocation in IVP non biopsied, biopsied, or biopsied and cultured during 2h, expanded grade-1 blastocysts after slow freezing or vitrification with different concentration of CRYO3.

	biopsy	n	Embryos with SOX2 (%LSmean ± sem)	No of cells		Mean ratio
				Total cells	SOX2 cells	(% Lsmean ± sem)
<i>P value groups</i>			0.0667	0.1589	0.2756	<0.0001
<i>Control</i>		103	86.3 ± 3.6	176.1 ± 7.9	28.0 ± 2.3	16.0 ± 0.3 ^a
<i>SF1</i>		144	93.5 ± 2.5	195.2 ± 6.4	27.0 ± 1.8	12.9 ± 0.2 ^b
<i>VS2</i>		50	80.4 ± 5.2	192.1 ± 10.4	22.3 ± 3.0	10.9 ± 0.3 ^c
<i>P value biopsy</i>			0.5526	0.2051	0.4582	0.0362
-		89	84.9 ± 4.1	175.4 ± 8.9	24.4 ± 2.6	13.5 ± 0.3 ^{a,b}
+		145	90.0 ± 2.6	194.4 ± 6.7	28.0 ± 1.9	13.5 ± 0.2 ^a
+2h		63	88.1 ± 4.4	193.6 ± 9.2	24.9 ± 2.6	12.5 ± 0.3 ^b
<i>P value groups*biopsy</i>			0.0864	0.1148	0.2511	<0.0001
Control	-	37	92.1 ± 4.4	145.3 ± 11.8 ^b	31.0 ± 3.4	21.3 ± 0.6 ^d
Control	+	51	85.0 ± 4.6	187.6 ± 9.8 ^{a,b}	29.3 ± 2.8	15.6 ± 0.4 ^b
Control	+ 2h	15	79.0 ± 9.4	195.4 ± 18.1 ^{a,b}	23.9 ± 5.2	12.2 ± 0.6 ^c
SF1	-	40	80.4 ± 5.8	189.8 ± 11.5 ^{a,b}	22.5 ± 3.3	10.7 ± 0.4 ^c
SF1	+	74	96.1 ± 2.2	189.1 ± 8.2 ^{a,b}	32.5 ± 2.3	17.2 ± 0.3 ^a
SF1	+ 2h	30	96.8 ± 3.2	206.8 ± 12.8 ^a	25.9 ± 3.7	11.5 ± 0.4 ^c
VS2	-	12	78.6 ± 11.0	191.2 ± 21.1 ^{a,b}	19.8 ± 6.0	10.4 ± 0.7 ^c
VS2	+	20	84.0 ± 7.3	206.5 ± 15.7 ^{a,b}	22.1 ± 4.5	9.0 ± 0.4 ^c
VS2	+ 2h	18	78.3 ± 86.0	178.6 ± 16.5 ^{a,b}	24.8 ± 4.7	13.9 ± 0.6 ^b

LSmeans ± sem were represented in the **Table 5**. When there was a significant difference in the variable, groups, biopsy, or groups*biopsy, (in grey raw), different superscripts were added in a column representing significant differences (p adjusted < 0.05). LSmeans ± sem = Least-square means ± standard error of means.

Discussion

This study was the first to our knowledge to describe the impact of cryopreservation solutions, formulated with CRYO3 on the cryosurvival of expanded grade-1 blastocysts non-biopsied, biopsied, and collapsed or biopsied and re-expanded. This was also one of the first to use the SOX2 staining to analyse the quality of the cryopreserved and thawed embryos.

Experiment 1

Our results made it possible to highlight the distribution of the SOX2 staining from the 7th day of development to the 9th. This study demonstrated that 48h of culture period, the number of total cells almost doubled while the number of SOX2 cells has decreased. This decrease was previously observed by several authors who obtained results like ours. Indeed, Van Soom and al., observed that, between the 6th and the 8th day of development the proportion of ICM cells / total cell was 31% on D6, 37% on D7, 29% on D8 ¹⁹ and 27% for hatched blastocysts ²⁰. On the 10th day of development only about 15% of cells belonging to the ICM remain ¹⁹. This decrease appears physiological and would correspond to the allocation of SOX2 to the epiblast ^{21,22}.

In mice, at the blastocyst stage, the cells of the epiblast and of the primary endoderm are distributed in a salt and pepper manner within the ICM. Epiblast cells strongly express Nanog, while the primary endoderm cells strongly express SOX17 and GATA6 and 4. OCT4 and SOX2 are detected in both cell types at this stage. At the expanded blastocyst stage, SOX2 is only detected in the epiblast in the same way as NANOG and OCT4 ²³. As demonstrated by Maruotti and al., in bovine embryos, SOX2 expression is restricted to the ICM of D8 blastocyst, while OCT4 is slowly down-regulated in the trophoblast at the expanded blastocyst stage ²⁴. Moreover, when embryos were not stressed by the freezing process a major part of the grade-1 expanded blastocysts selected on D7 still expressed SOX2 on D9 and has an average of 300 total cells and 37 pluripotent SOX2 cells, with an average ratio of 13%. This justifies the use of SOX2 staining to evaluate the ICM of bovine expanded grade-1 blastocyst between the 7th and the 9th day of development.

Experiment 2

Synthetic cryopreservation media composed of 20 or 100% CRYO3, used in slow freezing on non-biopsied embryos, have no impact on the survival rates and on the number of total and SOX2 cells except for the SF1 group (20% of CRYO3 in slow freezing protocol), which allowed to obtain embryos with higher number of total cells. These results agreed with the literature where authors have obtained comparable results. Bruyère and al., used the same cryopreservation solution than those used in this study, SF1, and demonstrated that when IVP bovine embryos were slow frozen and thawed, the survival

rate was 81.5% and the hatching rate was 61.1%¹¹. SF1 appears to be more suitable for slow freezing of non-biopsied bovine embryo and could therefore be used as a substitute for commercial solution containing, for the most part, animal-derived protein like BSA or SVF³⁻⁵. As the use of CRYO3 made it possible to obtain embryos with a mean number of total cells greater than the control, it would be interesting to carry out TUNEL analysis before embryos transfer, to verify whether a difference in the number of apoptotic cells exists between both groups which may explain a decrease in the number of total cells. It is known that the freezing process leads to an increase in the apoptotic and reactive oxygen species levels within the blastocyst²⁵. Moreover, several studies agreed that ICM cells are more fragile than trophectoderm cells²⁶⁻²⁸, therefore indicating that if freezing process is deleterious for the embryos, it will be even more so at the level of the ICM.

Unlike the results obtained with the slow freezing protocol, vitrification was detrimental to the cryosurvival of non-biopsied embryos. These results disagreed with the literature where most of the time, the cryosurvival rates of IVP bovine blastocysts are better in vitrification than in slow freezing^{5,29,30}. However, it seems difficult to compare survival and hatching rates among different studies because several factors, such as culture media composition and culture conditions, have strong impacts on the embryo's freezability³¹. Moreover, some disadvantages to the used of vitrification have been reported. Vitrification protocols require advanced technical skills and special equipment and are not suitable today for field conditions due to the impossibility of carrying out direct transfers and the management of a high volume of embryos³². Vitrification can induce, premature hardening of the zona pellucida³³, reduce the total pore surface of the zona pellucida³⁴, as well as a decrease in the expression of implantation genes³⁵. The presence of liquid in blastocoele cavity may impacted blastocyst quality during cryopreservation by the formation of ice crystals which causes physical damage and reduced cryosurvival rate³⁶. This could therefore explain the decrease of cryosurvival rate of vitrified non-biopsied embryos. Indeed, it was possible that the presence of the blastocoelic cavity has been damaging to the vitrified embryos and that the hardening of the zona pellucida has also resulted in a decrease in the hatching rate.

Experiment 3

Cryosurvival rate, 48h post thawing decreased when embryos were vitrified (VS2) in comparison with the control (77.4% vs. 93.0%). There was no impact of the biopsy on the re-expansion rate but there was an interaction between the experimental groups and the biopsy. Interestingly, non-biopsied embryos were sensitive to vitrification, while biopsied (+) and biopsied and recultured (+2h) embryos were not. This was not observed for embryos slow frozen in the control or SF It was possible that this groups. It was possible that this increase in cryosurvival rate for the biopsied and vitrified embryos was

due to the fact that embryos were collapsed after biopsy. These results have previously been described in the literature. In fact, when mouse blastocysts were artificial collapse and vitrified, the hatching rate was higher than the non-collapse embryos, respectively 61% vs. 47.33% ($p < 0.05$), as well as the implantation rate, respectively 56.3% vs. 47.4% ($p < 0.05$)³⁷. These results were also obtained with bovine blastocysts^{36,38}, where it was shown that collapsing the embryos led to a decrease in gestation and birth rates after slow freezing (33.3 vs. 22.2%) or vitrification (46.7 vs. 35.6%). However, it was possible that this increase in cryosurvival rate was due to the absence of zona pellucida rather than the blastocoel collapses itself. It has been demonstrated that biopsied embryos, put back in culture for 2h until they begin to re-expand and then vitrified (without their zona pellucida), allowed obtaining better re-expansion rate than non-biopsied embryos, respectively 42% vs. 37%³⁹. These results are consistent with those obtained in this study. When the embryos were biopsied and put back in culture during 2h before being vitrified, the cryosurvival rates were intermediate (“-” 41.8% < “+2h” 74.2% < “+” 95.1%) to those obtained when the embryos were vitrified whole or biopsied and collapsed. These results suggesting that there is a barrier effect of the zona pellucida in addition to a blastocoel effect. As describe above, the zona pellucida in vitrified embryos has a tendency to harden and the size of the pores present within this membrane decrease, thus limiting exchanges with the external environment³⁴. It is then possible that the zona pellucida was not sufficiently permeable to the vitrification medium, whose viscosity was very high, to ensure optimal protection of cells.

To verify whether the increase in cryosurvival results was due to the absence of zona pellucida or to the collapse of the blastocoel, embryos were biopsied and then put back in culture during 2h. After the 2h, all embryos were re-expanded and then they were slow frozen or vitrified. No difference in re-expansion rates was demonstrated. It would therefore seem that the re-expansion of the blastocoele was not totally beneficial to the cryosurvival of the vitrified embryos and it was rather the absence of the zona pellucida which was favourable to the cryosurvival of bovine embryos vitrified with VS2.

Conclusions

In conclusion, the use of 20% CRYO3 in the slow freezing medium, did not impact the cryosurvival rates of bovine embryos in comparison with the control group, whether they were non-biopsied, biopsied/collapsed, or biopsied/re-expanded. When the non-biopsied embryos were slow frozen, it notably led to an increase in the number of cells per embryo and a decrease in the ratio of SOX2 / total cells, indicating embryos more advanced in their development having probably less suffered during the freezing process than their counterparts slow frozen with the control protocol. Moreover a 13% increase in the hatching rate was observed for these embryos providing information on further development because without hatching pregnancy is impossible. This synthetic medium is therefore an alternative to traditional media containing animal derived products and it would be interesting to test its effectiveness by carrying out embryo transfers.

Concerning the use of the CRYO3 in vitrification, it was the 100% CRYO3 solution which allowed obtaining the best results. Although the use of CRYO3 on non-biopsied embryos did not make it possible to obtain interesting cryosurvival rates, on biopsied embryos it was quite the opposite. Indeed, cryosurvival rates as high as control have been obtained and no differences in SOX2 and total cell number was highlighted. However, the use of VS2 on collapsed biopsied embryos was more appropriate than on biopsied re-expanded embryos.

References

1. Humblot, P. *et al.* Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Vet Med Int* **2010**, 192787 (2010).
2. De Sousa, R. V. *et al.* Biopsy of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* does not affect pregnancy rates. *Theriogenology* **90**, 25–31 (2017).
3. Bettencourt, E. M. V. *et al.* Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved *in vivo* produced ovine embryos. *Theriogenology* **71**, 947–958 (2009).
4. Hasler, J. F. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* **22**, 119–125 (2010).
5. Zander-Fox, D., Lane, M. & Hamilton, H. Slow freezing and vitrification of mouse morula and early blastocysts. *J Assist Reprod Genet* **30**, 1091–1098 (2013).
6. Sudano *et al.*, M. J. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=lipid+content+and+apoptosis+of+in+vitro+produced+bovine+embryos+as+determinants+of+suceptibility> (2011).
7. Thompson, J. G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* **45**, 27–40 (1996).
8. Givens, M. D. & Marley, S. D. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology* **69**, 129–136 (2008).
9. Lazzari, G. *et al.* Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* **67**, 767–775 (2002).
10. Young, L. E., Sinclair, K. D. & Wilmut, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* **3**, 155–163 (1998).
11. Bruyère, P. *et al.* Improved cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology* **78**, 1294–1302 (2012).
12. Teixeira, M. *et al.* Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology* **85**, 113–119 (2018).
13. Gómez, E. *et al.* Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured *in vitro* and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology* **146**, 39–47 (2020).
14. Gavin-Plagne, L. *et al.* Insights into Species Preservation: Cryobanking of Rabbit Somatic and Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* **21**, E7285 (2020).
15. Gavin-Plagne, L., Commin, L., Bruyère, P., Buff, S. & Joly, T. Comparison Between an Animal-Derived Product Medium and a Chemically Defined Medium for Ram Sperm Cryopreservation. *Biopreserv Biobank* **17**, 11–17 (2019).
16. Janati Idrissi, S. *et al.* Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either *in vivo* or *in vitro* before and after slow freezing process. *Sci Rep* **11**, 11618 (2021).
17. Konishi, M. *et al.* Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* **45**, 573–581 (1996).
18. Janati Idrissi, S. *et al.* Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either *in vivo* or *in vitro* before and after slow freezing process. <https://www.researchsquare.com/article/rs-176817/v1> (2021) doi:10.21203/rs.3.rs-176817/v1.

19. Van Soom, A., Ysebaert, M. T. & de Kruif, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* **47**, 47–56 (1997).
20. Van Soom, A., Boerjan, M., Ysebaert, M. T. & De Kruif, A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Mol Reprod Dev* **45**, 171–182 (1996).
21. Goissis, M. D. & Cibelli, J. B. Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **81**, 962–970 (2014).
22. Khan, D. et al. Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=laurence+gall+OCT4> (2012).
23. Frankenberg, S. et al. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell* **21**, 1005–1013 (2011).
24. Maruotti, J. et al. Efficient derivation of bovine embryonic stem cells needs more than active core pluripotency factors. *Mol Reprod Dev* **79**, 461–477 (2012).
25. López-Damián, E. P. et al. Cryopreservation induces higher oxidative stress levels in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*. *Theriogenology* **143**, 74–81 (2019).
26. Ramos-Ibeas, P. et al. Senescence and Apoptosis During *in vitro* Embryo Development in a Bovine Model. *Front Cell Dev Biol* **8**, 619902 (2020).
27. Leidenfrost, S. et al. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. *PLoS One* **6**, e22121 (2011).
28. Pampfer, S. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages—a review. *Placenta* **21 Suppl A**, S3-10 (2000).
29. Inaba, Y. et al. Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=cryopreservation+method+affects+DNA+fragmentation+in+trophectoderm+and+the+speed+of+re-expansion+in+bovine+blastocysts> (2016).
30. Mucci, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* **65**, 1551–1562 (2006).
31. Gómez, E. et al. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* **69**, 1013–1021 (2008).
32. Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Taiyeb, A. M., Campos-Chillon, F. & Ross, P. J. Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reprod. Domest. Anim.* **55**, 659–676 (2020).
33. Tian, S.-J. et al. Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of *in vitro* matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Anim Reprod Sci* **101**, 365–371 (2007).
34. Moreira da Silva, F. & Metelo, R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. *Reprod Domest Anim* **40**, 205–209 (2005).
35. Moussa, M. et al. Vitrification alters cell adhesion related genes in pre-implantation buffalo embryos: Protective role of β -mercaptoethanol. *Theriogenology* **125**, 317–323 (2019).
36. Min, S.-H. et al. Forced collapse of the blastocoel cavity improves developmental potential in cryopreserved bovine blastocysts by slow-rate freezing and vitrification. *Reprod Domest Anim* **49**, 684–692 (2014).
37. Sehati, R. et al. Different Origin, Different Response: Gene Expression Pattern in Collapsed Vitrified Blastocyst. *Reprod Biol* **19**, 158–164 (2019).

38. Min, S.-H., Lee, E., Son, H.-H., Yeon, J.-Y. & Koo, D.-B. Forced collapse of the blastocoel enhances survival of cryotop vitrified bovine hatching/hatched blastocysts derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Cryobiology* 66, 195–199 (2013).
39. Vajta, G., Holm, P., Greve, T. & Callesen, H. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied, and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 47, 501–509 (1997).

Conclusions et perspectives

Le CRYO3 (Stem alpha, St Laurent de Chamouset, France) est un milieu breveté synthétique sans produits d'origine animale. Deux concentrations ont été évaluées (20 et 100%) dans un protocole de congélation lente et de vitrification. Une première expérience a été menée sur embryons entiers compte tenu de la lourdeur du protocole de biopsie, et en partant du principe qu'un protocole délétère pour des embryons entiers le sera davantage pour des embryons biopsiés du fait de leur plus grande fragilité. Le protocole permettant l'obtention des meilleurs résultats sur embryons entiers est le protocole contenant 20% de CRYO3 en congélation lente. Il permet l'obtention de taux de cryosurvie identique au témoin, une augmentation du nombre total de cellules 48h post décongélation et une diminution du ratio cellules SOX2/ cellules totales, reflétant des embryons ayant un stade de développement plus avancé. A l'inverse, quelle que soit la concentration de CRYO3 utilisée, la vitrification était délétère à la cryosurvie des embryons bovins entiers. Elle entraînait une diminution d'environ 50% des taux de cryosurvie. Cependant, l'utilisation de 100% de CRYO3 en vitrification permettait l'obtention d'embryons avec un nombre total de cellules identique à celui obtenu avec le protocole contenant 20% de CRYO3 en congélation lente et une diminution du ratio cellules SOX2/ cellules totales reflétant des embryons plus avancés dans leur développement. Sur embryon entier, le protocole contenant 20% de CRYO3 serait une alternative au protocole utilisé actuellement contenant des produits d'origine animale.

Afin d'évaluer l'impact du CRYO3 sur embryons biopsiés, la concentration de 20% de CRYO3 en congélation lente a été retenue. Pour vérifier si la vitrification est néfaste aux embryons biopsiés de la même manière que pour les entiers, la concentration de 100% de CRYO3 en vitrification a été testée. Quel que soit le lot expérimental considéré, le fait de biopsier les embryons ne semble pas affecter les taux de survie obtenus après réchauffement et culture ni le nombre total de cellules et le nombre de cellules SOX2. La biopsie semble même bénéfique à la vitrification de l'embryon bovin avec 100% de CRYO3 puisqu'elle a permis l'obtention de taux de cryosurvie deux fois supérieur à ceux obtenus sur embryons entier. Ces protocoles pourraient être considérés comme des alternatives intéressantes aux protocoles actuels contenant des produits d'origine animale, pour la cryoconservation de l'embryon bovin produit *in vitro* et biopsié.

Afin de vérifier si l'amélioration des taux de cryosurvie observée sur embryons biopsiés et vitrifiés était due au fait que les embryons étaient collapsés (c'est-à-dire sans cavité blastocoelique et donc sans réservoir à cristaux de glace) une remise en culture de 2h post biopsie a été réalisée afin que le blastocœle se reforme. Il a été mis en évidence que la ré-expansion du blastocœle n'affectait pas les taux de cryosurvie des embryons congelés et vitrifiés. Bien que les taux de ré-expansion des embryons biopsiés/remis en culture/vitrifiés avec 100% de CRYO3 étaient bien supérieurs à ceux obtenus sur embryons entiers (73,8 vs. 42,3%), ils étaient plus faibles que lorsque les embryons sont uniquement biopsiés et vitrifiés (73,8 vs. 96,3%). Finalement, concernant les embryons vitrifiés, la biopsie semble bénéfique à la fois par l'absence de blastocœle mais également par l'absence de zone pellucide. Que les embryons soient entiers, biopsiés ou, biopsiés et remis en culture 2h, le protocole de congélation lente à 20% de CRYO3, ne diminue pas les taux de cryosurvie.

7. Discussion Générale et perspectives

Objectifs Généraux

Le but de cette thèse était d'établir des protocoles de production *in vitro* et de cryoconservation optimisés qui permettent d'améliorer la viabilité des embryons PIV biopsiés et cryoconservés et donc, *in fine*, les taux de gestation après transfert dans des femelles receveuses. Pour ce faire deux axes de recherche ont été explorés :

- un premier concernant l'étude et la modulation du profil lipidique des embryons connu pour être corrélé à l'aptitude des embryons à survivre à la cryoconservation ;
- un deuxième concernant l'étude d'un nouveau protocole de cryoconservation, utilisant des milieux synthétiques, en tant qu'alternatives aux protocoles actuels et permettant d'améliorer la cryosurvie des embryons PIV biopsiés.

La modulation du profil lipidique : une bonne stratégie ?

Etude du profil lipidique des embryons et de l'impact du processus de PIV sur ce profil

La plus grande sensibilité des embryons PIV à la cryoconservation semble être en partie liée à une composition lipidique déviante par rapport à leurs homologues produits *in vivo*. Cependant, les études existantes (González-Serrano et al., 2013; Leão et al., 2015, 2017; Sudano et al., 2016), n'ont jamais comparé la composition lipidique individuelle des embryons PIV/vivo à partir des mêmes femelles. De ce fait, le premier travail mené dans cette thèse a été d'étudier le profil lipidique individuel d'embryons biopsiés produits *in vivo* vs. *in vitro* à partir des mêmes femelles et analysés à l'état frais ou après congélation, il a été démontré que les processus de PIV et de congélation avaient tous les deux un impact important sur le profil lipidique des embryons et ce de manière indépendante du sexe.

En effet, les embryons produits *in vivo* étaient, de manière générale, moins riches en lipides que leurs homologues produits *in vitro* bien qu'ils possédaient une surabondance de glycérophospholipides non oxydés connus comme composants majeurs des membranes, importants pour le maintien d'une bonne fluidité (Seidel, 2006). Les embryons produits *in vitro* présentaient une surabondance de triglycérides et de glycérophospholipides oxydés. Ces augmentations seraient dues aux conditions de culture des embryons PIV, où les protéines

d'origine animale contenues dans les milieux induisent une augmentation de la concentration en lipides neutres et une augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (Sudano et al., 2011; Thompson, 1996).

L'augmentation de glycérophospholipides oxydés serait également liée aux conditions de culture. En effet, il a été démontré que l'ajout de facteurs de croissance, d'hormones et de sérum stimulait le métabolisme oxydatif qui conduirait à l'oxydation des acides gras dérivés des triglycérides dégradés dans le cycle de Krebs (Ferguson and Leese, 1999; Rieger et al., 1998). De plus, une forte tension en oxygène génèrerait un stress oxydatif qui se traduirait par une augmentation des niveaux de ROS cellulaires (Ciray et al., 2009) et des niveaux d'apoptose (Ma et al., 2017) conduisant à une diminution des taux de blastocystes à J8 (Bermejo-Alvarez et al., 2010). Les glycérophospholipides oxydés sont connus pour être impliqués dans le déclenchement de l'apoptose par altération des fonctions des protéines membranaires sans que les mécanismes moléculaires ne soient connus à ce jour. De plus, par leur présence au sein des bicouches lipidiques, ils entraîneraient la modification des températures de transition de phase lors du processus de congélation (Wallgren et al., 2013). De ce fait, il est donc tentant d'imaginer que la surabondance de glycérophospholipides oxydés peut en partie expliquer la moins bonne cryosurvie des embryons PIV et les moins bons taux de gestation observés après transfert.

Ainsi, plusieurs auteurs ont essayé de diminuer ce contenu lipidique en privant les embryons de sources de protéines et/ou d'énergie sur les dernières 24h de culture, afin d'améliorer la capacité des embryons à être congelés et, *in fine*, les taux de gestation (Gómez et al., 2017; Murillo-Ríos et al., 2017; Singh et al., 2009). Contrairement à ce que l'on pourrait imaginer, il semblerait que la présence de BSA permette une augmentation de la lipophagie lorsque des hépatocytes de souris sont privés de source d'énergie (Cui et al., 2021). Les auteurs expliquent que la présence de BSA lors d'une privation de source d'énergie permettrait d'intercepter les efflux d'acide gras et réduirait ainsi les fortes concentrations de TG intracellulaires. De cette manière, la BSA permettrait de protéger d'une lipotoxicité associée à une accumulation d'acides gras. Ces auteurs expliquent également que la déplétion en glucose et en sérum induit un efflux d'acides gras 7 fois supérieur au témoin, et que cet efflux était même 10 fois supérieur au témoin lorsque les acides aminés étaient également retirés. Ces résultats suggèrent que l'efflux d'acides gras à la suite d'une privation d'énergie est principalement dû à la privation de

sérum et de glucose. L'utilisation de BSA n'est pas une solution durable pour la culture de l'embryon bovin puisque la filière souhaite s'affranchir de l'ajout de protéines d'origine animale dans le processus de PIV. Gómez et al. ont démontré qu'en remplaçant la BSA par du PVA sur les dernières 24h de culture, ils obtenaient des résultats de développement similaires à ceux obtenus lorsque les embryons sont cultivés en présence de BSA. Fait intéressant, ils ont également démontré que le PVA permettait de réduire le contenu en gouttelettes lipidiques mais uniquement lorsque les embryons sélectionnés à J6 étaient des morulas. Lorsque les embryons sélectionnés à J6 étaient de jeunes blastocystes, aucune différence en terme de contenu en gouttelettes lipidiques n'a été mise en évidence (Gómez et al., 2017). Le PVA serait donc une alternative à la BSA qui conduit à des résultats équivalents en termes de lipophagie lorsque les embryons sélectionnés à J6 étaient de jeunes blastocystes et même supérieurs lorsque les embryons sélectionnés à J6 étaient au stade morula. Ces résultats amènent une notion intéressante qui est qu'il faudrait éventuellement « ré-allouer » les embryons selon leur stade à J6 pour réaliser une phase de culture finale différenciée et ainsi optimiser le processus de lipophagie.

La surabondance de glycérophospholipides dans les embryons produits *in vivo*, notamment en phosphatidylinositol, sérine, glycérol et éthanolamine serait un marqueur de réussite à la cryoconservation (Leão et al., 2017; Sudano et al., 2012). En effet Sudano et al., ont démontré qu'une diminution du contenu en PC (32:1) et (34 :1). dans les embryons de genre *Bos taurus* était associée à une diminution des taux de cryosurvie, faisant de ces glycérophospholipides des biomarqueurs de réussite à la cryoconservation. Des résultats similaires ont décrit qu'une diminution du contenu en PC(34 :1) et (42 :7) dans les embryons vitrifiés, de race *Nellore*, était un biomarqueur négatif du succès à la cryopréservation (Leão et al., 2017). Cette abondance de phospholipides ne se limiterait donc pas aux PC, comme le suggère nos résultats.

En plus d'être un marqueur de la réussite à la cryopréservation, les PC permettent de diminuer les niveaux d'inflammation au sein des embryons de zebra fish ayant subi des irradiations (Szabó et al., 2016). En effet, ajoutés au milieu de développement des embryons juste avant irradiation à raison de 194 $\mu\text{M/L}$, les PC ont permis d'inhiber l'expression de facteurs de l'inflammation comme NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et l'interleukine-1 β . Cette diminution de l'inflammation a permis une diminution de la létalité et des dommages provoqués par les irradiations aux organes (Szabó et al., 2016). Un

dysfonctionnement du métabolisme des glycérophospholipides a également été démontré dans le syndrome des ovaires polykystiques. Les auteurs ont mis en évidence que les femmes atteintes de ce syndrome présentaient une diminution du contenu en PC dans le fluide folliculaire, pouvant en partie expliquer leur condition (Liu et al., 2019). Il a été démontré que dans le fluide oviductal bovin, le contenu en PC augmentait durant la phase pré-ovulatoire. Cette augmentation permettrait la déstabilisation des membranes spermatiques facilitant la capacitation (Banliat et al., 2020). Ainsi, un bon fonctionnement du métabolisme des glycérophospholipides semble crucial pour le bon développement cellulaire, car en plus d'être des éléments structuraux des membranes, ce sont des médiateurs lipidiques impliqués dans de nombreuses voies de signalisation et précurseur de bio molécules.

Bien que des différences métaboliques existent entre les embryons mâles et femelles (Khurana and Niemann, 2000; Lonergan et al., 2004; Ramos-Ibeas et al., 2019), l'impact du processus de PIV n'a pas impacté le profil lipidique des embryons, ainsi une modulation sexe dépendante du profil lipidique des embryons n'est pas nécessaire. Basé sur cette observation, le sexe des embryons n'a pas été évalué dans la suite des expérimentations menées.

Modulation du profil lipidique des embryons par l'alimentation de la femelle donneuse

Il a également été démontré que la modulation de facteurs affectant la donneuses d'ovocyte avait un effet sur le profil lipidique ovocytaire. En effet la modulation de l'alimentation de la femelle donneuse, notamment par l'ajout d'acides gras de type oméga 3 dans l'alimentation a permis d'améliorer la fonction de reproduction des femelles, en augmentant le nombre de follicules ponctionnés par ovaire et les taux de blastocystes expansés de bonne qualité (Q1 + Q2) après PIV (Freret et al., 2019b). Cet ajout d'oméga 3 a également permis de moduler le profil lipidique du fluide folliculaire après 5 semaines de supplémentation et par conséquent des ovocytes collectés. De façon surprenante, nous avons mis en évidence au cours de nos travaux que le profil des embryons PIV issus de ces mêmes vaches supplémentées en oméga 3 n'a pas été modifié contrairement à ce qui avait été observé au niveau ovocytaire. Il est possible que la période de culture *in vitro* lisse les différences acquises au niveau de l'ovocyte. Cette hypothèse est confortée par Sata et al. qui ont montré que des blastocystes cultivés sans sérum avaient un profil lipidique proche de celui d'ovocytes immatures, alors que des blastocystes

cultivés en présence de sérum avaient un profil lipidique proche du sérum utilisé avec notamment de hauts niveaux d'acide palmitique, stéarique, oléique linoléique et linoléique (Sata et al., 1999). L'accumulation d'acides gras saturés ou insaturés à longue chaîne au sein des embryons proviendrait donc directement du sérum. Afin de valider cette hypothèse, il serait pertinent d'analyser en spectrométrie de masse différents stades de développement embryonnaire *in vitro* obtenus à partir de vaches supplémentées en oméga 3 ou non pour évaluer la dynamique « d'effacement » du différentiel de composition lipidique observé au stade ovocytaire et ainsi cibler les périodes critiques. De plus, afin de vérifier si les différences acquises par l'ovocyte se maintiennent au stade blastocyste expansé en conditions physiologiques, il aurait pu être intéressant de collecter des embryons 7 à 8 jours après inséminations de vaches supplémentées ou non en oméga 3.

Ainsi, la supplémentation des femelles donneuses en oméga 3 semble être une stratégie prometteuse pour améliorer la qualité des ovocytes et le rendement de production embryonnaire (après OPU-FIV) sans pour autant modifier le profil lipidique des embryons produits. Etant donné que le sérum semble être en partie responsable de la déviation de profil lipidique des embryons PIV (Kim et al., 2001; Sata et al., 1999), il serait intéressant d'ajouter des omégas 3 dans un milieu dépourvu de serum afin de limiter les effets négatifs de l'ajout de sérum et d'éviter que celui-ci ne masque pas les effets des omégas 3.

Prérequis à la modulation du profil lipidique in vitro : Quels critères d'évaluation ?

Afin d'évaluer l'effet de la modulation de la qualité des embryons PIV par l'ajout d'acide gras de type oméga 3 dans les milieux de culture, il a été décidé d'évaluer les taux de développement des embryons ainsi que les taux de cryosurvie. Etant donné que ces paramètres sont généralement faiblement discriminants et peu corrélés aux taux de gestation après transfert, nous avons décidé d'utiliser un immunomarquage des cellules embryonnaires afin d'évaluer l'état de pluripotence des cellules de la masse cellulaire interne à l'aide des marqueurs SOX2 et CDX2. Cet immunomarquage était intéressant et a permis de mettre en évidence qu'entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour de développement le nombre de cellules exprimant SOX2 diminuait alors que le nombre de cellules totales augmentait fortement conduisant à une diminution du ratio cellules SOX2 sur cellules totales. Ces observations sont cohérentes avec

d'autres études qui ont montré que, après 7 jours de développement, la MCI représente en moyenne 40% des cellules des blastocystes expansés (Lane and Gardner, 1997; Leidenfrost et al., 2011; Van Soom et al., 1996, 1997a; Wooldridge et al., 2019b) alors qu'après 10 jours de développement elle ne représente plus que 16% des cellules embryonnaires avec en moyenne 34 cellules dans la MCI sur les 212 cellules totales (Van Soom et al., 1997b). Cette diminution du nombre de cellules SOX2 est physiologique et correspond à la différenciation des différents feuilletts embryonnaires au sein de la MCI pour former l'hypoblaste et l'épiblaste qui formeront respectivement le sac vitellin et l'embryon proprement dit (Frankenberg et al., 2011b; Ortega et al., 2020b). La diminution des cellules SOX2 correspond à la restriction de SOX2 à l'épiblaste (Avilion et al., 2003). De plus en adéquation avec ces résultats, il a été montré chez l'embryon de souris que l'expression de GATA-binding protein 6 (GATA6) réprime l'expression de SOX2 (Wicklow et al., 2014a) qui est un marqueur connu de l'hypoblaste (Ortega et al., 2020b) (Figure 12.).

Dans notre étude, l'idéal aurait été d'immunomarquer les cellules à l'aide de SOX2 et GATA6 puisque l'immunomarquage a été réalisé après 9 jours de développement et que certains blastocystes présentaient des cellules ni marquées par SOX2 ni par CDX2 ce qui présageait une expression de GATA6. Cependant, étant donné que le marquage GATA6 n'a pas été réalisé nous ne pouvons pas être certains que les cellules non marquées soient des cellules de l'hypoblaste. Il est possible que les noyaux non marqués correspondent à de la fragmentation d'ADN et ne correspondent pas à des cellules viables.

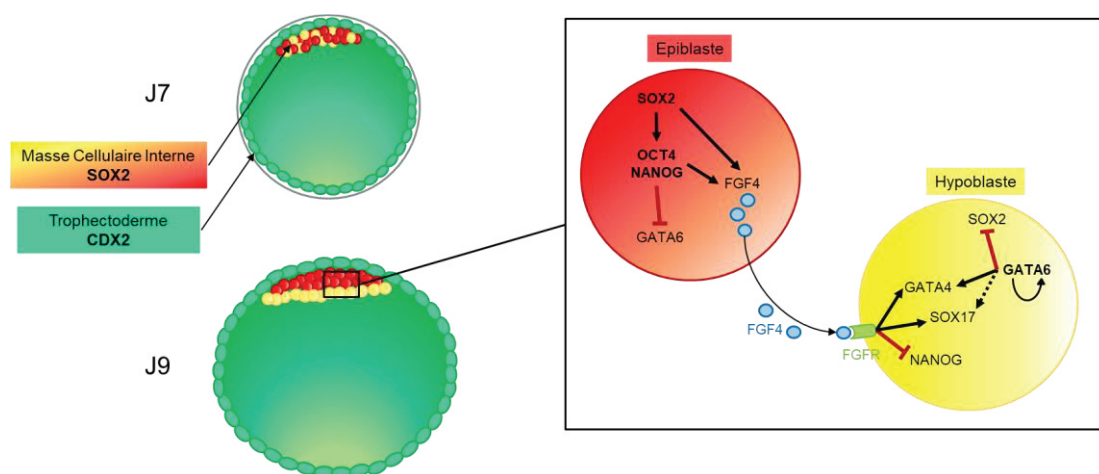


Figure 12. Représentation schématique de la spécification des lignages cellulaires au cours des premiers stades embryonnaires chez les bovins. Répartition en « poivre et sel » de l'épiblaste (rouge) et de l'hypoblaste (jaune) au stade blastocyste (J7), puis restriction de SOX2 à l'épiblaste au stade blastocyste expansé (J9).

Modulation de la qualité des embryons PIV par l'ajout d'acide gras de type oméga 3

Avant d'ajouter des oméga 3 dans les milieux de culture aux différentes phases du processus de PIV, il a été nécessaire de valider si les récepteurs cellulaires à ces molécules étaient bien présents à tous les stades de développement. En effet, il avait déjà été mis en évidence que le récepteur au DHA, FFAR4, est présent au niveau ovocytaire, aussi bien au sein des cellules de la granulosa qu'au niveau de l'ovocyte (Elis et al., 2017). Cependant aucune étude n'avait mis en évidence, à notre connaissance, la présence de FFAR4 après le processus de fécondation. Ainsi, après avoir réalisé un immunomarquage de FFAR4 sur des COCs, des embryons au stade 2 cellules et des blastocystes, nous avons pu mettre en évidence la présence de FFAR4 tout au long du développement embryonnaire. Ces résultats viennent appuyer l'intérêt de l'ajout de DHA dans les milieux de culture aux différentes phases du processus de PIV.

L'ajout de DHA à hauteur de 20 μ M dans le milieu de maturation des ovocytes (MIV), n'a pas entraîné de modification des taux de blastocystes totaux, de façon cohérente avec la littérature (Hoyos-Marulanda et al., 2019; Oseikria et al., 2016). Cependant, nous avons montré que l'ajout de 20 μ M de DHA dans le milieu de MIV ou durant l'ensemble du développement (MIV + développement) a entraîné une diminution du taux de blastocyste Q1. Seul l'ajout de DHA durant la phase de développement uniquement n'a pas impacté les taux de développement et de blastocystes Q1. Le seul point positif de l'ajout de DHA dans notre étude était la diminution du ratio de cellules SOX2/totales. Cette diminution du ratio semblait être associée à une plus grande prolifération du nombre de cellules totales et à une diminution du nombre de cellules exprimant SOX2. Comme décrit précédemment, la diminution du ratio de cellules SOX2 associée à un nombre élevé de cellules totales témoignerait d'embryons plus avancés dans leur développement. La difficulté dans cette étude était que la puissance statistique du dispositif était insuffisante pour mettre en évidence des différences significatives dans le nombre de cellules totales et de cellules SOX2 ou du moins que la variabilité expérimentale liée à d'autres paramètres non maîtrisés (variabilité individuelle liée aux femelles donneuses) vienne masquer l'effet du DHA s'il existe. Ce défaut de puissance est également illustré par les résultats contrastés obtenus dans le lot supplémenté en DHA uniquement pendant la phase de MIV ou une première expérience nous indiquait que cette supplémentation permettait l'obtention de résultats supérieurs au témoin, alors qu'une deuxième expérience réalisée avec des effectifs plus importants n'a cette fois-ci pas mis en évidence de différence. De ce fait, si un effet du DHA

existe sur les paramètres mesurés, il est apparemment trop faible pour être mis en évidence statistiquement avec un risque alpha de 5 ou 10%. L'analyse en spectrométrie de masse de la composition lipidique des embryons des différents lots expérimentaux aurait pu permettre d'objectiver des différences plus fines. Néanmoins, les essais étant nécessairement menés sur ovaires collectés en abattoir, il aurait été difficile de s'affranchir totalement de la variabilité individuelle liée aux femelles donneuses (race, stade physiologique, alimentation, état de santé...) dans ce type d'étude.

En parallèle de l'effet du DHA, cette étude a également permis de mettre en évidence que la congélation impactait fortement le nombre de cellules totales et de cellules SOX2. En effet, lorsque les embryons étaient congelés et remis en culture pendant 48h (correspondant à un stade J9), le nombre de cellules totales était proche de celui observé pour des embryons frais à J7 (respectivement 194,4 vs. 183,3), alors que des embryons non congelés à J9 possédaient en moyenne 335 cellules totales. On pourrait alors penser que la congélation, en stoppant le métabolisme, retarde la reprise des mitoses post-décongélation et que des embryons 48h post-décongélation pourraient être assimilés à des embryons frais à J7. Cependant, le nombre de cellules exprimant SOX2 est également fortement diminué, ne reflétant pas un arrêt du métabolisme mais plutôt une dégradation des cellules pluripotentes. En effet, après 7 jours de développement les embryons possédaient en moyenne 76,4 cellules exprimant SOX2 par embryon et plus que 50,9 à J9, alors que les embryons congelés à J7 puis remis en culture sur 48h présentaient en moyenne 26,5 cellules. Cette diminution de moitié du nombre de cellules exprimant SOX2 par rapport aux embryons au même jour de développement mais non congelés, met en évidence une sensibilité des cellules de la MCI et du trophoctoderme à la congélation et laisse penser que la diminution du nombre de cellules par embryon après congélation et remise en culture ne soit finalement pas uniquement due à un arrêt du métabolisme et des mitoses mais bien à une combinaison d'effets, dont la destruction des cellules par la congélation. De plus, à l'état frais 100% des blastocystes Q1 sélectionnés à J7 possédaient des cellules exprimant SOX2 alors qu'après décongélation de blastocystes Q1 congelés à J7 seul 66,1% des embryons présentaient des cellules exprimant SOX2 confirmant la sensibilité des cellules pluripotentes à la congélation. Ces embryons n'exprimant plus SOX2 n'ont aucune chance d'aboutir à une gestation entraînant la naissance d'un individu. Il a cependant été mis en évidence que bien que les taux d'implantation soit bien moindre que

ceux obtenus avec le transferts de blastocystes, les vésicules trophoblastiques étaient capables de s'implanter lorsque que les transferts étaient réalisés sur femelles ovariectomisées (33% vs. 81%). Ces vésicules trophoblastiques ne présentaient aucune cellule embryonnaire après implantation (Surani and Barton, 1977b). Il serait donc intéressant de comparer les taux de gestation en lien avec ces données d'immunomarquage. Cependant, aujourd'hui aucun marquage vital de la pluripotente n'existe. Il pourrait être envisagé de vérifier si ces données d'immunomarquage sont en lien avec des données de morphocinétique ou de métabolisme, permettant ainsi de trier les embryons avant transfert et d'éviter le transfert de vésicule trophoblastique.

Il semblerait que les cellules de la masse cellulaire interne soient, de par leur nature, plus sensibles que les cellules du trophoctoderme (Leidenfrost et al., 2011; Pampfer, 2000). La proportion de cellules en apoptose serait relativement faible et stable dans le trophoctoderme tout au long du développement *in vitro* alors qu'elle augmenterait dans la masse cellulaire interne et majoritairement au moment de l'expansion du blastocyste (Figure 13.) (Ramos-Ibeas et al., 2020). Il a été démontré qu'après 6 jours de développement *in vitro*, lorsque les blastocystes ne sont pas expansés, le taux d'apoptose dans la MCI était de 6% alors qu'ils étaient de 27% à J7 sur blastocystes expansés ou en cours d'éclosion (Leidenfrost et al., 2011). Ces mêmes auteurs ont démontré que, quel que soit l'origine des embryons (*in vivo* ou *in vitro*), le taux d'apoptose ne différait pas et restait plus élevé dans la MCI que dans le TE (proportion médiane *in vitro* et *in vivo*, respectivement, 16 et 17% dans la MCI et 5 et 3% dans le TE). Il aurait donc été intéressant de multiplier les critères d'évaluation de la qualité en analysant également la mort cellulaire même si chaque critère d'évaluation supplémentaire conduit à une démultiplication du dispositif expérimental compte-tenu de l'invasivité des méthodes utilisées. Dans notre étude, la supplémentation en DHA dans le milieu de développement a permis l'obtention de la plus grande proportion d'embryons avec du marquage SOX2, en comparaison au lot témoin non supplémenté (respectivement 75,3% vs. 63,3%). Pour que cette différence ait pu être mise en évidence de façon significative, il aurait fallu environ 130 embryons analysés par groupe soit plus de 1000 COCs mis en FIV ce qui semble peu réaliste. De ce fait, on peut donc seulement émettre l'hypothèse que le DHA, *via* son incorporation aux membranes cellulaires et l'activation de ses récepteurs, pourrait jouer un rôle protecteur sur les cellules de la MCI lors du processus de congélation et réchauffement.

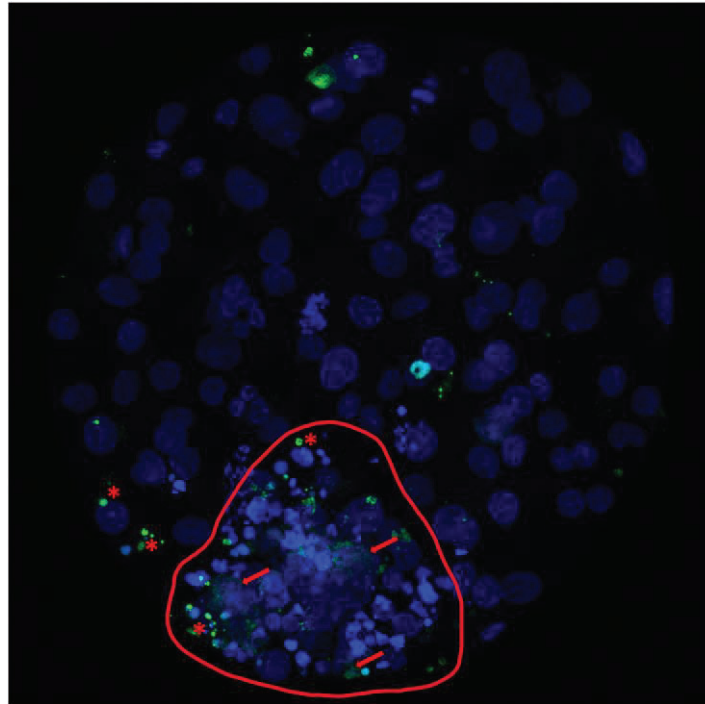


Figure 13. Analyse de la mort cellulaire dans un blastocyste bovin expansé produit *in vitro*. Le marquage au bisbenzimidazole (bleu) permet de visualiser tous les noyaux et le marquage TUNEL (vert) permet de visualiser les structures apoptotiques. Les astérisques rouges marquent les noyaux TUNEL. Certaines structures TUNEL positives condensées peuvent apparaître sous forme de corps apoptotiques plus petits contenant de la chromatine condensée. Les flèches rouges marquent les noyaux en cours de nécrose (structures TUNEL positives avec des bords peu distincts). Une incidence élevée de formes identifiées et reconnaissables de mort cellulaire, ont été identifiées au sein de la masse cellulaire interne (entourée en rouge) en contraste avec les cellules du trophoctoderme qui ne présentent que très peu de structures apoptotiques (Ramos-Ibeas *et al.*, 2020).

Peu de données existent sur l'impact du DHA sur l'embryon et encore moins via l'activation de ses récepteurs et des voies métaboliques qui en découlent (Elis *et al.*, 2017; Oseikria *et al.*, 2016). Cependant, l'étude de voies de signalisation sous-jacentes à l'activation du GPR120 (G-protein coupled receptor 120 ou FFAR4) par le DHA ont été étudiées sur d'autres modèles cellulaires. Il a notamment été démontré que sur cellules pancréatiques murines, l'ajout de DHA permettait, grâce à l'activation de son récepteur GPR120, d'inhiber la lipotoxicité induite par l'exposition des cellules à de l'acide palmitique mais également de diminuer l'inflammation (Wang *et al.*, 2019). Au sein d'hépatocytes murins exposés à des oxydants, le DHA a permis d'inhiber, via l'activation de son récepteur le GPR120, la mitophagie induite par le stress oxydatif en augmentant l'expression de facteurs de protection permettant le renouvellement et le maintien de l'homéostasie mitochondriale (Chen *et al.*, 2021). Chez la souris, le DHA inhibe l'apoptose induite par l'ischémie faisant suite à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne,

toujours par l'intermédiaire de son récepteur GPR120 (Ren et al., 2019). L'activation par le DHA de multiples voies de signalisation, limitant l'apoptose, la mitophagie ou encore l'inflammation met en évidence l'intérêt d'utilisation de cet acide gras.

Dans cette première partie expérimentale, nous avons montré que le profil lipidique des embryons est fortement impacté par les conditions dans lesquelles ils ont été produits (*in vivo* vs. *in vitro*) soulignant l'importance de travailler sur l'optimisation des conditions de culture *in vitro* pour se rapprocher des embryons s'étant développés en conditions physiologiques. L'effet d'une supplémentation en DHA combinée au DMSO et à la carnosine n'a pas entraîné d'impacts majeurs sur les paramètres observés conduisant à des incertitudes sur son intérêt pour moduler le profil lipidique des embryons PIV. Seule une compréhension fine des mécanismes et voies de signalisation par lesquels le profil lipidique des embryons est impacté en fonction de leur stade de développement permettra à l'avenir d'adapter les conditions de culture *in vitro*.

L'amélioration des protocoles de cryoconservation : un enjeu ?

Nous avons décrit l'impact de la production *in vitro* des embryons sur le profil lipidique des embryons. En plus du système de production, nous avons démontré que les protocoles de congélation des embryons avaient également un impact sur le profil lipidique des embryons, justifiant d'essayer de les faire évoluer (nature et concentrations en cryoprotecteurs, temps d'incubation, cinétiques de refroidissement et de réchauffement) pour minimiser l'impact sur le profil lipidique des embryons et améliorer, *in fine*, les taux de gestation après transfert.

Le protocole de congélation lente, le plus fréquemment utilisé pour la congélation de l'embryon bovin par les entreprises de sélection françaises, entraîne une diminution du contenu en lysophospholipides et notamment en LPC en comparaison à des embryons frais, non congelés. Ces résultats ne semblent pas restreints au protocole utilisant de l'éthylène glycol et du sucre. En effet, lorsque les embryons sont congelés avec le protocole glycérol-tréhalose aucun des LPC identifiés comme significativement différents entre les embryons frais et congelés avec le protocole éthylène-glycol sucre n'ont été retrouvés. Ces résultats suggèrent une fragilité des LPC au processus de congélation lente. D'après la littérature, au sein des embryons, les LPC permettraient la formation d'acide lysophosphatidique (LPA) stimulant

l'expression de marqueurs de la qualité embryonnaire comme IGFR2, PLAC8 et OCT4, indiquant qu'il pourrait affecter la qualité des embryons bovins et les voies de pluripotence (Boruszewska et al., 2015, 2016) (Figure 14.).

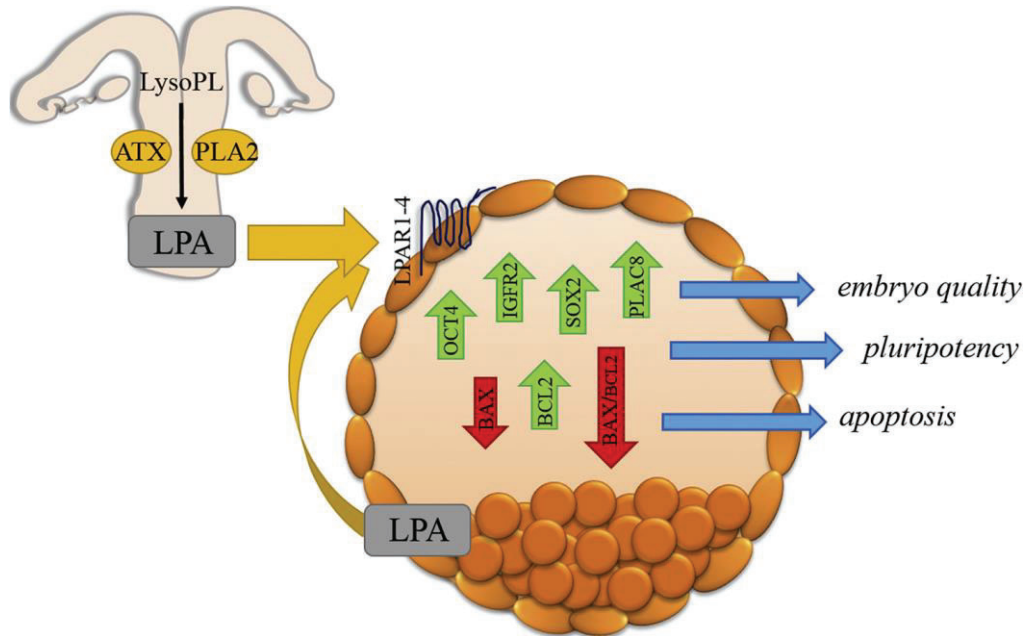


Figure 14. Modèle schématique illustrant une possible voie de signalisation activée par l'acide lysophosphatidique durant le développement pré-implantatoire de l'embryon bovin. ATX, autotaxin; IGF2R, insulin-like growth factor 2 receptor; LPA, lysophosphatidic acid; LPAR1-4, lysophosphatidic acid receptors 1-4; OCT4, octamer-binding transcription factor 4; PLA2, phospholipase A2; PLAC8, placenta-specific 8 gene; SOX2, sex-determining region Y-box 2. Tiré de (Boruszewska et al., 2016).

De plus, le LPA régule la voie HIPPO en inhibant les kinases Last1/2 et en diminuant la phosphorylation de YAP/TAZ entraînant sa translocation nucléaire et l'augmentation de la différenciation cellulaire via l'expression de CDX2 (Nishioka et al., 2009; Qin et al., 2016; Yu et al., 2012) (Figure 15.). Ainsi, une diminution du contenu en LPC pourrait entraîner une diminution du contenu en LPA et ainsi déstabiliser la voie HIPPO entraînant une altération de la différenciation cellulaire pouvant en partie expliquer la moindre qualité des embryons produits *in vitro* et congelés.

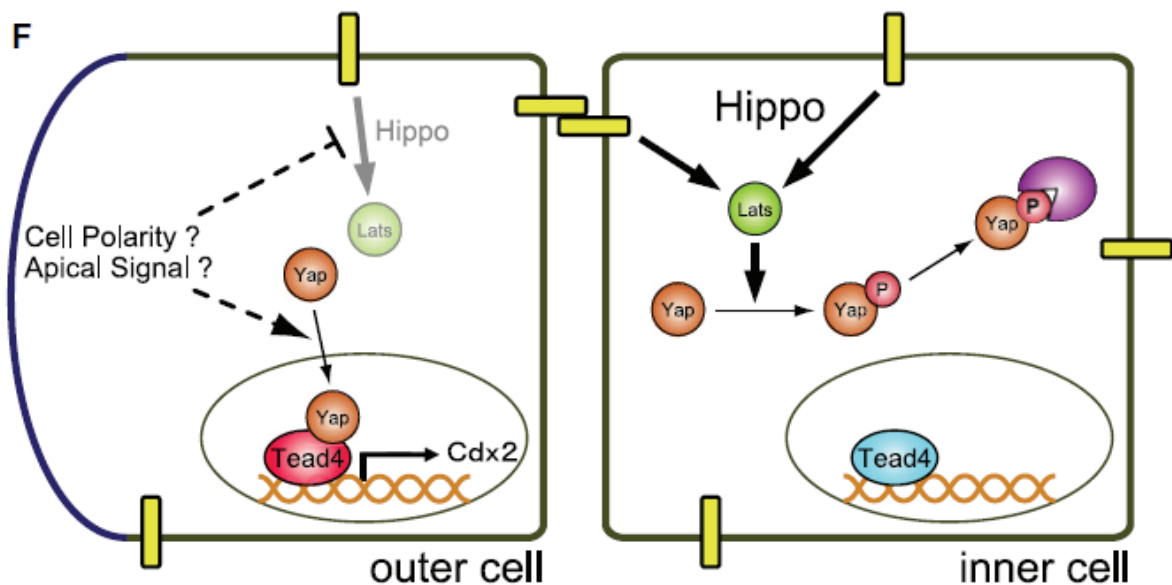


Figure 15. Modèle de différenciation cellulaire en fonction de la position des cellules au sein de l'embryon. Tiré de (Nishioka et al., 2009).

Les lysophospholipides du fait de leur structure sont plus hydrophiles et versatiles que leurs homologues les phospholipides. Au sein de la membrane bactérienne d'E. Coli, leur structure en cône inversée leur confèrerait des propriétés de détergents, capable de remodeler la membrane plasmique par la formation de plis ou de micelles (Zheng et al., 2017). L'insertion de LPL dans la membrane plasmique entrainait une diminution du cout énergétique de déformation membranaire et de formation de canaux, entrainant une augmentation de la perméabilité membranaire (Lundbaek and Andersen, 1994). On peut donc imaginer que la dégradation des LPC par le processus de congélation entraine une diminution de la perméabilité, ainsi qu'une rigidification membranaire. Dans les cellules eucaryotes, les LPL sont des ligands de protéines G et leur transports à travers la membrane est indispensable à l'activation de certaines protéines, ou pour l'absorption de molécules comme le DHA (Nguyen et al., 2014). En effet, il a été démontré que lorsque des embryons de souris sont invalidés pour le gène *Mfsd2a*, récepteur des LPL, une diminution de 58.8% de la concentration de DHA au niveau cérébrale est observée dès le stade E18.5 (avant la naissance). Les souris déficientes pour ce gène présentaient une augmentation de la mortalité post natal, des dysfonctions moteurs ainsi qu'une diminution de la taille de leurs cerveaux. Indiquant que ce récepteur joue un rôle essentiel dans le maintien des niveaux de DHA durant l'embryogenèse et dans le développement cérébral normal (Nguyen et al., 2014). Ainsi le maintien des niveaux de LPL et

du DHA durant la période embryonnaire et fœtale est essentiel au bon développement des individus.

L'ajout de LPC ou directement de LPA dans le milieu de culture des embryons pourrait donc être envisagé pour améliorer la qualité des embryons produits. L'ajout de LPA à hauteur de 10 μ M, dans le milieu de culture d'embryons bovins, n'a eu aucun effet sur le développement et la qualité des embryons jusqu'à J8 mais a permis de diminuer l'expression de BAX (BCL2 associated-X protein), facteur pro apoptotique et d'augmenter l'expression de BCL2, facteur anti-apoptotique et d'IGFR2, facteur de croissance cellulaire (Torres et al., 2014). Une étude réalisée sur embryons porcins a mis en évidence des résultats similaires. L'ajout de 10 μ M de LPA dans le milieu de maturation des ovocytes a ainsi permis d'augmenter les taux de blastocystes, le nombre de cellules totales par blastocyste et de diminuer le nombre de cellules en apoptose (Zhang et al., 2015). Ainsi, en limitant l'apoptose et en stimulant la croissance cellulaire, le LPA semble être un facteur important pour le bon développement et la survie des embryons. Mesurer le contenu en LPA avant et après congélation permettrait de vérifier si le LPA est aussi sensible à la congélation que son précurseur le LPC et ainsi confirmer que la voie de signalisation LPC-LPA est impactée.

Ce qui est certain c'est que le profil lipidique des embryons bovins est modulé de différentes manières en fonction du protocole de congélation lente utilisé. Nous avons démontré dans notre étude que le protocole utilisant de l'éthylène glycol et du sucrose était plus adapté à la congélation de l'embryon bovin par rapport au protocole utilisant du glycérol et du tréhalose. En effet, il a permis une meilleure préservation des glycérophospholipides décrits comme marqueurs d'une meilleure cryosurvie (Sudano et al., 2012). La réalisation de transferts aurait permis de vérifier si l'impact de la congélation sur le profil lipidique des embryons se confirme par une diminution des taux de gestation.

Toutes ces modifications induites par la congélation de l'embryon bovin mettent en avant le fait que les protocoles actuels ne permettent pas une cryoconservation optimale des embryons, et justifient leur optimisation en jouant sur la nature et la concentration des cryoprotecteurs utilisés en lien avec les cinétiques de refroidissement et de réchauffement.

Aujourd'hui la majorité des milieux de congélation/vitrification contiennent des protéines d'origines animales ne permettant pas une sécurité sanitaire absolue et l'obtention de résultats

reproductibles. Modifier la composition des milieux de cultures pour les rendre entièrement synthétique est donc un prérequis nécessaire à toute tentative d'optimisation des protocoles. C'est pourquoi nous avons décidé d'évaluer l'intérêt du CRYO3 en congélation lente et en vitrification sur embryons bovins, entiers et biopsiés. Notre étude a permis de mettre en évidence que l'utilisation d'un milieu de congélation lente contenant 20% de CRYO3 en plus de l'éthylène glycol et du sucrose a permis une meilleure cryopréservation des embryons bovins entiers. En effet, bien que les taux de ré-expansion et d'éclosion n'aient pas été différents du lot témoin, le milieu contenant 20% de CRYO3 a tout de même permis l'obtention d'un taux d'éclosion supérieur au témoin de 13% (79,7 vs. 66,4%). De plus, 48h après décongélation les embryons congelés avec 20% de CRYO3 présentaient un nombre de cellules totales supérieur au témoin (respectivement 195,1 vs. 141,9) pour un nombre de cellules exprimant SOX2 similaire, indiquant une meilleure cryopréservation des embryons. Utilisé sur embryon biopsié, ce protocole n'altère ni les taux de cryosurvie ni le nombre de cellules totales ou exprimant SOX2. Des résultats similaires ont été décrits dans la littérature (Bruyère et al., 2012b; Gómez et al., 2020). En effet, ces auteurs ont démontré que l'utilisation de la même solution de cryopréservation que celle utilisée dans notre étude, sur embryons entiers et à hauteur de 20% de CRYO3, avait permis l'obtention de taux de cryosurvie et d'éclosion similaires à ceux obtenus dans notre étude, soit 81.5% et 61.1% (Bruyère et al., 2012a) et 80.1% et 67.3% (Gómez et al., 2020). Ce protocole synthétique pourrait donc constituer une alternative particulièrement importante pour les protocoles de congélation lente contenant des dérivés de produits d'animaux.

Des résultats différents ont été obtenus pour les essais de vitrification. En effet, la vitrification des embryons entiers n'a pas été concluante puisqu'elle ne permettait la survie que d'environ 40% des embryons 48h après réchauffement. Cependant, de manière surprenante, la vitrification s'est montrée beaucoup plus prometteuse sur embryons biopsiés. La biopsie a été favorable à la cryosurvie des embryons vitrifiés avec 100% de CRYO3, permettant l'obtention de résultats équivalents à ceux obtenus en congélation lente avec 20% de CRYO3. Il est possible que la zone pellucide soit une barrière trop peu perméable, ne laissant pas diffuser les hautes concentrations de cryoprotecteurs utilisées en vitrification, limitant alors la déshydratation cellulaire, notamment dans les couches plus profondes comme au niveau de la MCI, favorisant alors la formation de cristaux de glace intracellulaires. Il a été démontré que la vitrification

entraînait un durcissement (Tian et al., 2007) et une réduction de la taille des pores (Moreira da Silva and Metelo, 2005) de la zone pellucide ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes de l'implantation (Moussa et al., 2019).

Dans ce sens, il s'est avéré que la vitrification d'embryons biopsiés et donc sans zone pellucide, conduisait à une meilleure cryosurvie des embryons. Ces résultats étaient d'autant plus vrais lorsque les embryons étaient tout juste biopsiés et donc collapsés que lorsque les embryons étaient biopsiés et ré-expansés après 2h de culture (respectivement 95,1% vs. 74,2%). La présence de blastocœle, potentiel réservoir de cristaux de glace, pourrait expliquer ces résultats et la diminution des taux de cryosurvie lorsque les blastocystes biopsiés sont vitrifiés après ré-expansion. Ces observations sont en cohérence avec les éléments bibliographiques disponibles chez les bovins comme chez d'autres espèces. En effet, lorsque des blastocystes de souris ont été artificiellement collapsés, les taux d'implantation étaient supérieurs aux embryons non collapsés 56,3% vs. 47,4% (Sehati et al., 2019). Sur blastocystes bovins, il a été démontré que des embryons biopsiés et remis en culture jusqu'à ré-expansion présentaient des taux de survie supérieurs à ceux obtenus à partir d'embryons non biopsiés (42% vs. 37%) (Vajta et al., 1997). Une autre étude, préconiserait de vitrifier les embryons à des stades plus précoces, comme au stade morula ou jeune blastocytes, lorsque la cavité blastocœlique n'est pas encore complètement formée (Zander-Fox et al., 2013). Ainsi, le protocole de vitrification contenant 100% de CRYO3 semble prometteur pour la vitrification de l'embryon bovin biopsié, immédiatement après biopsie, sans phase de ré-expansion.

Afin de vérifier si les protocoles de cryoconservation contenant du CRYO3 (congélation lente et vitrification) permettent une préservation des lipides, l'analyse du profil lipidique des embryons pourrait être réalisée de façon comparative avec le protocole de référence actuel. De plus, afin de s'assurer que ces protocoles permettent l'obtention de taux de gestation au moins identiques à ceux obtenus avec le protocole témoin contenant des dérivés de produits d'origine animale, des transferts d'embryons pourraient être envisagés.

Dans cette étude nous n'avons pas eu le temps de réaliser la combinaison du protocole de production *in vitro* le plus intéressant avec le protocole de congélation lente ou de vitrification à base de CRYO3. Cette étude nous aurait permis de vérifier si les effets bénéfiques des protocoles pris séparément, se cumulent et permettent l'obtention d'embryons de meilleure qualité après réchauffement.

Qu'aurait-on pu faire d'autre pour améliorer les taux de gestation des embryons PIV biopsiés et cryoconservés ?

On a vu précédemment que certains auteurs avaient étudiés des stratégies pour délipider l'embryon en le privant de sources protéiques en fin de culture ce qui était bénéfique à sa cryosurvie (Gómez et al., 2017; Murillo-Ríos et al., 2017; Singh et al., 2009) alors que d'autres études suggèrent l'ajout d'acides gras de type oméga 3 pour améliorer la qualité embryonnaire (Freret et al., 2019b; Marei et al., 2017; Moallem et al., 2013; Oseikria et al., 2016). La combinaison de ces approches n'a jamais été testée et pourrait constituer une approche à court terme intéressante pour répondre à nos objectifs. On pourrait imaginer cultiver les ovocytes et embryons dans des milieux où le sérum serait remplacé par un substitut synthétique pour induire une lipophagie et diminuer le contenu en lipides neutres des embryons et dans lesquels on ajouterait des acides gras de type oméga 3, comme le DHA, permettant d'améliorer la qualité des embryons et les rendre moins sensibles au processus de cryoconservation. Le lycopène semble être un composé intéressant puisqu'en plus de délipider les embryons, il possède plusieurs propriétés permettant d'améliorer la qualité embryonnaire. En effet, en plus de réduire de moitié le contenu lipidique des embryons, il permet de diminuer les taux d'apoptose et d'augmenter les taux de développement (Chowdhury et al., 2017, 2018; Residiwati et al., 2021). De plus couplé à l'addition d'acide gras l'ajout d'un anti-oxydant est systématique. Bien que la carnosine ait un effet positif sur la cinétique de développement et les taux de cryosurvie des embryons bovins (Bourhis et al., 2017), peu de données concernant son utilisation dans les milieux de culture embryonnaire existent dans la littérature. Ajouté dans l'alimentation de rats exposés à du formaldéhyde à hauteur de 150 mg/kg/jour elle permet de diminuer les niveaux d'oxydation (TOS : total oxydant status) et d'augmenter les niveaux d'antioxydants (TAS : total antioxydant status) au niveau rénal, hépatique et plasmatique (Akkoc et al., 2021). Lorsque des cellules de l'épithélium tubaire rénal (HK2) sont exposées à des ROS (H₂O₂) pendant 24h puis à de la carnosine à hauteur de 60 mmol/L, les taux de viabilité cellulaire sont augmentés et les niveaux de ROS sont diminués. Elle permettrait également d'inhiber l'apoptose via la voie mitochondriale (Cao et al., 2021). Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence un effet bénéfique de la carnosine que ce soit sur la cinétique de développement ou sur la cryosurvie. L'étude de l'apoptose ou des niveaux de ROS aurait pu nous en apprendre davantage sur les effets de la carnosine sur l'embryon bovin.

Bien que la culture *in vitro* des embryons dans du fluide oviductal soit toxique pour les embryons (Lopera-Vasquez et al., 2017), il a été démontré que plus les embryons se développaient *in vivo*, au sein de l'oviducte, meilleure était leur survie à la cryopréservation (Havlicek et al., 2010; Rizos et al., 2002). De cette manière on pourrait imaginer la création d'organoïdes, reflétant l'environnement oviductal pour le développement *in vitro* des embryons. Les organoïdes d'oviducte ou de trompes de Fallope sont complexes puisqu'ils miment les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques de l'épithélium tubaire. Il a été démontré qu'ils répondent aux hormones (œstrogènes et progestérone) et qu'ils présentent des cellules ciliées et sécrétantes (Kessler et al., 2015). Ils peuvent être conservés plusieurs mois en culture en gardant le phénotype d'épithélium. Les principales limites sont qu'aujourd'hui les organoïdes d'oviducte ne sont pas en trois dimensions et ne représentent pas finement l'environnement dans lequel évolue l'embryon *in vivo*. De plus, leur fabrication et les connaissances des différentes communications qui existent entre les différents types cellulaires restent empiriques. Les organoïdes offrent de belles perspectives de recherche mais ne sont pas prêts à être utilisés pour la culture d'embryons (Cui et al., 2020).

Si la culture des embryons au sein d'organoïdes en trois dimensions n'est pas encore possible, cultiver les embryons en présence de vésicules extracellulaires (EVs) provenant de l'épithélium tubaire l'est totalement et a fait l'objet de nombreuses études. Les EVs sont de petites vésicules, de l'ordre de 30 à 1000 nm retrouvées aussi bien au sein de l'oviducte, que sécrétées *in vitro* par des cellules épithéliales d'oviducte bovin (BOEC) (Al-Dossary and Martin-Deleon, 2016; Almiñana et al., 2017; Lopera-Vásquez et al., 2016). Les BOEC participent au développement précoce de l'embryon notamment en sécrétant des facteurs de croissance embryotropes. Cependant la coculture de ces cellules avec les embryons ne permet pas d'assurer la reproductibilité des résultats et présente un risque sanitaire. L'étude de la composition des EVs a permis de mettre en évidence qu'elles contiennent des ARN, ARNm, miARN, des lipides et des protéines. Ajoutées au milieu de culture des embryons, les EVs permettraient d'augmenter les taux de cryosurvie post décongélation (Almiñana et al., 2017). De plus, les EVs ont permis une diminution du ratio MCI/nombre total de cellules (27,8% vs. 32%) et une augmentation ratio TE/nombre total de cellules (72,1% vs. 67,9%), décrivant des embryons plus avancés dans leur développement. Cependant, en fonction de leurs origines, elles ne semblent pas avoir les mêmes effets sur les embryons. En effet, il a été démontré que les EVs du sérum étaient délétères à la cryosurvie des

embryons et que lorsque celui-ci en était déplété, les taux de cryosurvie augmentaient (Lopera-Vásquez et al., 2016). De cette manière, étudier le contenu des vésicules extracellulaires sécrétées par les BOEC ou retrouvées dans le fluide oviductal est une piste de recherche intéressante et pourrait permettre à terme la création de vésicules synthétiques pouvant délivrer à l'embryon les facteurs embryotrophes dont il a besoin.

La difficulté majeure que nous rencontrons aujourd'hui dans la modulation du système de culture des embryons est le problème de puissance statistique des dispositifs expérimentaux pour conclure avec certitude à la présence ou l'absence d'un effet du facteur étudié. L'optimisation des conditions de culture passe par des petites optimisations incrémentales sans possibilité d'innovation de rupture. De ce fait, les effets bénéfiques attendus ne sont pas importants, dépassant rarement 5 à 10% de gain pour les taux de gestation. Or, pour mettre en évidence statistiquement de telles différences, un nombre élevé d'embryons transférés est nécessaire (environ 1500 transferts par groupe pour une différence de 5%) ce qui semble irréaliste dans un contexte expérimental. La création d'un réseau de receveuses pour la réalisation de transferts à grande échelle pourrait être une solution. Cependant le manque de contrôle de différents paramètres pourrait entraîner une augmentation de la variabilité dans les résultats nécessitant un nombre d'individus bien plus importants. En effet, de multiples paramètres concernant la femelle receveuse sont à prendre en compte, comme son état de santé, sa génétique, son âge et la rigueur avec laquelle les protocoles de synchronisation sont réalisés pour gérer au mieux le synchronisme physiologique embryon-utérus. En plus de ces paramètres, des facteurs environnementaux s'ajoutent comme, la température et l'humidité extérieures ou encore les conditions d'élevage (gestion de l'alimentation...). Enfin, la réalisation des transferts embryonnaires par des techniciens expérimentés a été démontré comme permettant une augmentation des taux de gestation (Demetrio et al., 2020). L'ensemble de ces facteurs compliquent donc l'utilisation d'un réseau de receveuses à grande échelle.

Depuis une dizaine d'années, la production d'embryon PIV s'est significativement améliorée, permettant une augmentation des taux de blastocystes, une meilleure cryotolérance, des taux de gestation augmentés et une diminution des pertes de fœtus ou de syndrome du gros veau (Demetrio et al., 2020). Ces améliorations se sont traduites par une forte augmentation du nombre d'embryons produits *in vitro* et transférés au niveau mondial (Figure 16).

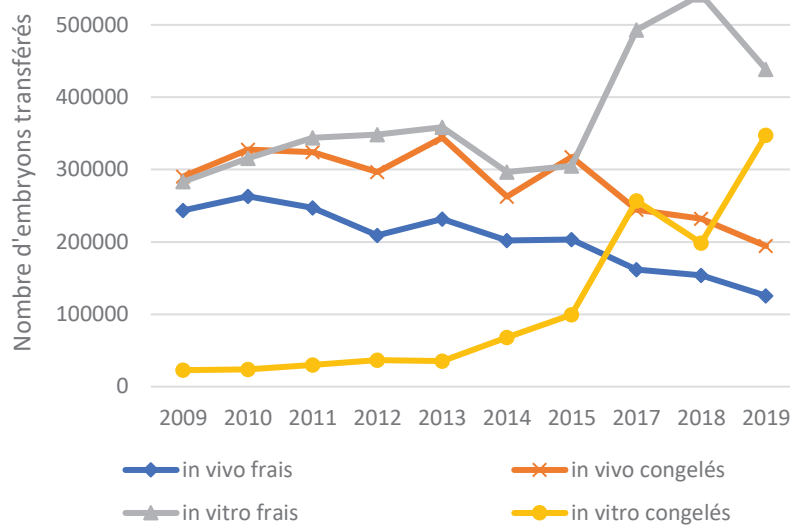


Figure 16. Nombre total d'embryons bovins produits *in vivo* et *in vitro* (IVP) et transférés à l'état frais ou après congélation. Ces données sont tirées des rapport annuels de l'I.E.T.S de 2009 à 2019 (<https://www.iets.org/Committees/Data-Retrieval-Committee>).

Cependant, mêmes si les résultats se sont améliorés, les embryons PIV restent différents de leurs homologues produits *in vivo* (Hansen, 2020). La qualité des ovocytes semble être le facteur clé déterminant la proportion d'ovocytes capables de se développer jusqu'au stade blastocyste (Lonergan et al., 2016). L'amélioration des conditions de culture et de cryoconservation des ovocytes et embryons a un effet majeur sur la qualité des embryons transférés et reste un levier d'amélioration des taux de gestation. Cependant, ces optimisations ne permettent pas la genèse d'innovation de rupture et l'obtention de taux de gestation beaucoup plus élevés que ceux obtenus actuellement par les entreprises de sélection. C'est une combinaison de petites innovations incrémentales couplées à des innovations de rupture qui permettra d'augmenter le progrès génétique réalisable annuellement.

Certains auteurs, ont imaginé comment accélérer de manière plus significative le progrès génétique, notamment en réduisant fortement l'intervalle de génération pourtant déjà raccourci avec l'avènement de la génomique. Plusieurs études ont été menées sur des animaux prépubères, où les auteurs ont réalisé des OPU-FIV à partir de femelles de 3 mois ou moins (Armstrong et al., 1997; Currin et al., 2017; Revel et al., 1995), permettant ainsi de faire naître de nouveaux individus alors que la femelle donneuse atteignait tout juste ses 1 an. Cette technique permet ainsi de réduire d'environ de 2 ans l'intervalle de génération (Currin et al.,

2021). Comme le stock d'ovocytes est établi durant la vie fœtale certains auteurs ont imaginé, dès les années 1990, des schémas de sélection où les ovocytes pourraient être prélevés *in utero* directement sur des fœtus femelles pour être fécondés *in vitro* (Georges and Massey, 1991). Cette stratégie présente deux avantages, (1) réduire très rapidement l'intervalle de génération en se passant des 9 mois de gestation et (2) avoir la capacité de surveiller le génotype sans exigence d'expression phénotypique. Ce concept est la « velogenetics » et pourrait ainsi être utilisé pour générer rapidement plusieurs générations sans recours à des animaux adultes et sans enregistrer le phénotype d'intérêt jusqu'à ce qu'un animal avec la configuration de marqueurs souhaitée soit obtenue.

De nos jours, certains auteurs imaginent même un schéma de sélection conceptuel encore plus intensif que la « velogenetics » : l'*in vitro* breeding où les schémas de sélection ne nécessitent plus le recours à des animaux vivants, l'intégralité de la chaîne de production se déroulant *in vitro*. En effet, Goszczynski et al. imaginent un schéma de sélection où les cellules souches embryonnaires pluripotentes situées dans la MCI des embryons sont dissociées puis cultivées *in vitro* avant d'être différenciées en gamètes, ovocytes et spermatozoïdes, permettant de répéter le processus de FIV sans recours à des animaux vivants (Goszczynski et al., 2019). Bien qu'aujourd'hui ces techniques de production *in vitro* de génération d'individus ne soient pas encore utilisées, certains auteurs ont réussi à produire des individus viables à partir de cellules souches pluripotentes sur modèle murin. En effet, Hübner et al. ont démontré qu'il était possible de produire des ovocytes-like à partir de cellules souches pluripotentes embryonnaires (ESC/iPS). Une fois transférées au sein d'ovaires reconstitués, ses ovocytes-like ont permis l'obtention d'une progéniture viable (Hübner et al., 2003). Ces technologies ne permettent pas encore une utilisation à plus grande échelle du fait du faible potentiel développemental des ovocytes-like (Hamazaki et al., 2021) mais ce n'est probablement qu'une question de temps. Ce schéma, pour l'instant imaginaire, permettrait de réduire l'intervalle de génération à 3 ou 4 mois seulement augmentant fortement le progrès génétique annuel tout en diminuant les coûts de gestion. La stratégie de sélection *in vitro* de souches cellulaires intéressantes pourrait même être combinée à l'édition du génome permettant ainsi de corriger le génome des différentes lignées cellulaires à la faveur des haplotypes les plus favorables. Des études ont permis de mettre en évidence, après simulation, que l'édition du génome permettait l'accélération du progrès génétique (Jenko et al., 2015).

Ces résultats mettent en lumière la course mondiale au progrès génétique où les entreprises de sélection, pour augmenter rapidement le progrès génétique et proposer une offre génétique compétitive, seraient prêtes à mettre en œuvre des schémas de sélection qui ne connaîtront pas ou peu d'animaux et ne nécessiteraient pas la naissance de veaux femelles. La production de veaux mâles, pour la diffusion du progrès génétique, reste indispensable à la production de semence en gros volume.

Probablement que, l'utilisation combinée de ces outils génétiques et génomiques de manière raisonnée révolutionnera dans les années à venir l'élevage bovin, lui permettant de faire face aux nombreux challenges qui s'imposent à lui. Cependant, on peut tout de même se poser la question de l'éthique de tels schémas de sélection et des conséquences à long terme de toutes ces interventions « *in vitro* ».

8. Références Bibliographiques

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., and 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. *Mol. Reprod. Dev.* *61*, 57–66.
- Abe, T., Kawahara-Miki, R., Hara, T., Noguchi, T., Hayashi, T., Shirasuna, K., Kuwayama, T., and Iwata, H. (2017). Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol. *J Reprod Dev* *63*, 455–461.
- Adamiak, S.J., Powell, K., Rooke, J.A., Webb, R., and Sinclair, K.D. (2006). Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* *131*, 247–258.
- Agca, Y., Monson, R.L., Northey, D.L., Peschel, D.E., Schaefer, D.M., and Rutledge, J.J. (1998). Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* *50*, 129–145.
- Aitken, R.J., and Drevet, J.R. (2020). The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants (Basel)* *9*, 111.
- Akkoc, R.F., Ogeturk, M., Aydin, S., Kuloglu, T., and Aydin, S. (2021). Effects of carnosine on apoptosis, transient receptor potential melastatin 2, and betatrophin in rats exposed to formaldehyde. *Biotech Histochem* *96*, 223–229.
- Al-Dossary, A.A., and Martin-Deleon, P.A. (2016). Role of exosomes in the reproductive tract Oviductosomes mediate interactions of oviductal secretion with gametes/early embryo. *Front Biosci (Landmark Ed)* *21*, 1278–1285.
- Ali, J., and Shelton, J.N. (1993). Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil* *99*, 471–477.
- Almiñana, C., Corbin, E., Tsikis, G., Alcântara-Neto, A.S., Labas, V., Reynaud, K., Galio, L., Uzbekov, R., Garanina, A.S., Druart, X., et al. (2017). Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction* *154*, 153–168.
- Alvarez, R.H., Meneghel, M., Martinez, A.C., Pires, R., and Schammas, E.A. (2008). Transfer of bovine blastocysts derived from short-term in vitro culture of low quality morulae produced in vivo. *Reprod Domest Anim* *43*, 257–260.
- Ambrogi, M., Dall'Acqua, P.C., Rocha-Frigoni, N., Leão, B., and Mingoti, G.Z. (2017). Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development in vitro. *Reprod Domest Anim* *52*, 409–421.
- Amstislavsky, S., Mokrousova, V., Brusentsev, E., Okotrub, K., and Comizzoli, P. (2019). Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. *Biopreserv Biobank* *17*, 76–83.
- Arav, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* *81*, 96–102.
- Arav, A., Zeron, Y., Leslie, S.B., Behboodi, E., Anderson, G.B., and Crowe, J.H. (1996). Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. - PubMed - NCBI.
- Armstrong, D.T., Kotaras, P.J., and Earl, C.R. (1997). Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod Fertil Dev* *9*, 333–339.

Assumpção, M.E.O.D., Milazzotto, M.P., Simões, R., Nicacio, A.C., Mendes, C.M., Mello, M.R.B., and Visintin, J.A. (2008). In vitro survival of in vitro-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification.

Avilion, A.A. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development* *17*, 126–140.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* *17*, 126–140.

Baldassarre, H., Currin, L., Michalovic, L., Bellefleur, A.-M., Gutierrez, K., Mondadori, R.G., Glanzner, W.G., Schuermann, Y., Bohrer, R.C., Dicks, N., et al. (2018). Interval of gonadotropin administration for in vitro embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2 and 6 months of age by repeated laparoscopy. *Theriogenology* *116*, 64–70.

Banliat, C., Le Bourhis, D., Bernardi, O., Tomas, D., Labas, V., Salvetti, P., Guyonnet, B., Mermillod, P., and Saint-Dizier, M. (2020). Oviduct Fluid Extracellular Vesicles Change the Phospholipid Composition of Bovine Embryos Developed In Vitro. *Int J Mol Sci* *21*.

Becker, C.A., Collier, R.J., and Stone, A.E. (2020). Invited review: Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows. *J Dairy Sci* *103*, 6751–6770.

Beebe, D., Wheeler, M., Zeringue, H., Walters, E., and Raty, S. (2002). Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology* *57*, 125–135.

Bermejo-Alvarez, P., Lonergan, P., Rizos, D., and Gutiérrez-Adan, A. (2010). Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod Biomed Online* *20*, 341–349.

Bertevello, P.S., Teixeira-Gomes, A.-P., Seyer, A., Vitorino Carvalho, A., Labas, V., Blache, M.-C., Banliat, C., Cordeiro, L.A.V., Duranthon, V., Papillier, P., et al. (2018). Lipid Identification and Transcriptional Analysis of Controlling Enzymes in Bovine Ovarian Follicle. *Int J Mol Sci* *19*.

Besenfelder, U., Brem, G., and Havlicek, V. (2020). Review: Environmental impact on early embryonic development in the bovine species. *Animal* *14*, s103–s112.

Best, B.P. (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res* *18*, 422–436.

Bettencourt, E.M.V., Bettencourt, C.M., Silva, J.N.C.E., Ferreira, P., de Matos, C.P., Oliveira, E., Romão, R.J., Rocha, A., and Sousa, M. (2009). Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology* *71*, 947–958.

Betteridge, K.J., and Fléchon, J.-E. (1988). The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology* *29*, 155–187.

Bianchi, E., and Wright, G.J. (2016). Sperm Meets Egg: The Genetics of Mammalian Fertilization. *Annu Rev Genet* *50*, 93–111.

Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., and Wright, G.J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. - PubMed - NCBI.

- Bielanski, A., and Lalonde, A. (2009). Effect of cryopreservation by slow cooling and vitrification on viral contamination of IVF embryos experimentally exposed to bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1. *Theriogenology* 72, 919–925.
- Boruszewska, D., Sinderewicz, E., Kowalczyk-Zieba, I., Grycmacher, K., and Woclawek-Potocka, I. (2015). The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 44.
- Boruszewska, D., Sinderewicz, E., Kowalczyk-Zieba, I., Grycmacher, K., and Woclawek-Potocka, I. (2016). Studies on lysophosphatidic acid action during in vitro preimplantation embryo development. *Domest. Anim. Endocrinol.* 54, 15–29.
- Bourhis, D.L., Verachten, M., Salvetti, P., Hochet, M., Schibler, L., Bourhis, D.L., Verachten, M., Salvetti, P., Hochet, M., and Schibler, L. (2017). 78 SUPPLEMENTATION WITH CARNOSINE DURING IN VITRO CULTURE IMPROVES THE QUALITY OF IN VITRO-PRODUCED BOVINE EMBRYOS. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 146–146.
- Bruyère, P., Baudot, A., Guyader-Joly, C., Guérin, P., Louis, G., and Buff, S. (2012a). Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. - PubMed - NCBI.
- Bruyère, P., Baudot, A., Guyader-Joly, C., Guérin, P., Louis, G., and Buff, S. (2012b). Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology* 78, 1294–1302.
- Bunel, A., Nivet, A.L., Blondin, P., Vigneault, C., Richard, F.J., and Sirard, M.A. (2020). The effects of LH inhibition with cetrorelix on cumulus cell gene expression during the luteal phase under ovarian coasting stimulation in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 72, 106429.
- Caamaño, J.N., Gómez, E., Trigal, B., Muñoz, M., Carrocera, S., Martín, D., and Díez, C. (2015). Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology* 83, 881–890.
- Cajas, Y.N., Cañón-Beltrán, K., Ladrón de Guevara, M., Millán de la Blanca, M.G., Ramos-Ibeas, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., and González, E.M. (2020). Antioxidant Nobiletin Enhances Oocyte Maturation and Subsequent Embryo Development and Quality. *Int J Mol Sci* 21, E5340.
- Calder, P.C. (2012). Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* 142, 592S-599S.
- Camara Pirez, M., Steele, H., Reese, S., and Kölle, S. (2020). Bovine sperm-oviduct interactions are characterized by specific sperm behaviour, ultrastructure and tubal reactions which are impacted by sex sorting. *Sci Rep* 10, 16522.
- Cao, Y., Xu, J., Cui, D., Liu, L., Zhang, S., Shen, B., Wu, Y., and Zhang, Q. (2021). Protective effect of carnosine on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human kidney tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 534, 576–582.
- Capalbo, A., Romanelli, V., Patassini, C., Poli, M., Girardi, L., Giancani, A., Stoppa, M., Cimadomo, D., Ubaldi, F.M., and Rienzi, L. (2018). Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril* 110, 870-879.e5.

- Cenariu, M., Pall, E., Cernea, C., and Groza, I. (2012). Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. *J Biomed Biotechnol* 2012, 541384.
- Chen, J., Wang, D., Zong, Y., and Yang, X. (2021). DHA Protects Hepatocytes from Oxidative Injury through GPR120/ERK-Mediated Mitophagy. *Int J Mol Sci* 22, 5675.
- Chiu, Y.-H., Karmon, A.E., Gaskins, A.J., Arvizu, M., Williams, P.L., Souter, I., Rueda, B.R., Hauser, R., Chavarro, J.E., and EARTH Study Team (2018). Serum omega-3 fatty acids and treatment outcomes among women undergoing assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 33, 156–165.
- Chowdhury, M.M.R., Choi, B.-H., Khan, I., Lee, K.-L., Mesalam, A., Song, S.-H., Xu, L., Joo, M.-D., Afrin, F., and Kong, I.-K. (2017). Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality in vitro. *Theriogenology* 103, 173–184.
- Chowdhury, M.M.R., Mesalam, A., Khan, I., Joo, M.-D., Lee, K.-L., Xu, L., Afrin, F., and Kong, I.-K. (2018). Improved developmental competence in embryos treated with lycopene during in vitro culture system. *Mol Reprod Dev* 85, 46–61.
- Cillard, J., and Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* 13, 24–29.
- Ciray, H.N., Aksoy, T., Yaramanci, K., Karayaka, I., and Bahceci, M. (2009). In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil Steril* 91, 1459–1461.
- Courbière, B., Baudot, A., Mazoyer, C., Salle, B., and Lornage, J. (2009). La vitrification : technique d’avenir pour la cryoconservation ovarienne ? Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 37, 803–813.
- Coy, P., García-Vázquez, F.A., Visconti, P.E., and Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* 144, 649–660.
- Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E., and Farin, C.E. (2001). Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 64, 1375–1385.
- Crowe, L.M., and Crowe, J.H. (1988). Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. *Biochim Biophys Acta* 946, 193–201.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54, 579–599.
- Cui, W., Sathyanarayan, A., Lopresti, M., Aghajan, M., Chen, C., and Mashek, D.G. (2021). Lipophagy-derived fatty acids undergo extracellular efflux via lysosomal exocytosis. *Autophagy* 17, 690–705.
- Cui, Y., Zhao, H., Wu, S., and Li, X. (2020). Human Female Reproductive System Organoids: Applications in Developmental Biology, Disease Modelling, and Drug Discovery. *Stem Cell Rev Rep* 16, 1173–1184.
- Currin, L., Michalovic, L., Bellefleur, A.-M., Gutierrez, K., Glanzner, W., Schuermann, Y., Bohrer, R.C., Dicks, N., da Rosa, P.R., De Cesaro, M.P., et al. (2017). The effect of age and length of gonadotropin stimulation on the in vitro embryo development of Holstein calf oocytes. *Theriogenology* 104, 87–93.
- Currin, L., Baldassarre, H., and Bordignon, V. (2021). In Vitro Production of Embryos from Prepubertal Holstein Cattle and Mediterranean Water Buffalo: Problems, Progress and Potential. *Animals* 11, 2275.

- Dard, N. (2008). Compaction et divergence de lignage dans l'embryon préimplantatoire de souris. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36, 1133–1138.
- De Sousa, R.V., Da Silva Cardoso, C.R., Butzke, G., Dode, M.A.N., Rumpf, R., and Franco, M.M. (2017). Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology* 90, 25–31.
- Demetrio, D.G.B., Benedetti, E., Demetrio, C.G.B., Fonseca, J., Oliveira, M., Magalhaes, A., and Dos Santos, R.M. (2020). How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Anim Reprod* 17, e20200053.
- Dirandeh, E., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Ganjkanlou, M., Ansari Pirsaraei, Z., and Fouladi-Nashta, A. (2013). Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations during the postpartum periods of early lactating dairy cows on milk yield, metabolic responses, and reproductive performances. *J. Anim. Sci.* 91, 713–721.
- Do, V.H., Walton, S., Catt, S., and Taylor-Robinson, A.W. (2017). A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. *Cryobiology* 77, 58–63.
- Do, V.H., Catt, S., Amaya, G., Batsiokis, M., Walton, S., and Taylor-Robinson, A.W. (2018). Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology* 120, 105–110.
- Elis, S., Freret, S., Desmarchais, A., Maillard, V., Cognié, J., Briant, E., Touzé, J.-L., Dupont, M., Favardin, P., Chajès, V., et al. (2016). Effect of a long chain n-3 PUFA-enriched diet on production and reproduction variables in Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci* 164, 121–132.
- Elis, S., Oseikria, M., Vitorino Carvalho, A., Bertevello, P.S., Corbin, E., Teixeira-Gomes, A.-P., Lecardonnel, J., Archilla, C., Duranthon, V., Labas, V., et al. (2017). Docosahexaenoic acid mechanisms of action on the bovine oocyte-cumulus complex. *J Ovarian Res* 10, 74.
- Enright, B.P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F.A., Yang, X., and 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.
- Eroglu, A., Bailey, S.E., Toner, M., and Toth, T.L. (2009). Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biol Reprod* 80, 70–78.
- Eyestone, W.H., and First, N.L. (1991). Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 35, 613–624.
- Fahy, G.M., Mouta, C. da, Tsonev, L., Khirabadi, B.S., Mehl, P., and Meryman, H.T. (1995). Cellular Injury Associated with Organ Cryopreservation: Chemical Toxicity and Cooling Injury. In *Cell Biology of Trauma*, (CRC Press), p.
- Fear, J.M., and Hansen, P.J. (2011). Developmental changes in expression of genes involved in regulation of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Biol. Reprod.* 84, 43–51.
- Ferguson, E.M., and Leese, H.J. (1999). Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* 116, 373–378.

- Feugang, J.M., Camargo-Rodríguez, O., and Memili, E. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science* 121, 141–149.
- Fisher, P., Hyndman, D., Bixley, M., Oback, F., Popovic, L., McGowan, L., and Berg, M. (2012). Potential for genomic selection of bovine embryos. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 72, 156–158.
- Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., and Chazaud, C. (2011a). Primitive Endoderm Differentiates via a Three-Step Mechanism Involving Nanog and RTK Signaling. *Developmental Cell* 21, 1005–1013.
- Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., and Chazaud, C. (2011b). Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev Cell* 21, 1005–1013.
- Freret, S., Oseikria, M., Le Bourhis, D., Desmarchais, A., Briant, E., Desnoes, O., Dupont, M., Le Berre, L., Ghazouani, O., Bertevello, P.S., et al. (2019a). Effects of a n-3 PUFA enriched diet on embryo production in dairy cows. *Reproduction*.
- Freret, S., Oseikria, M., Bourhis, D.L., Desmarchais, A., Briant, E., Desnoes, O., Dupont, M., Le Berre, L., Ghazouani, O., Bertevello, P.S., et al. (2019b). Effects of a n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet on embryo production in dairy cows. *Reproduction* 158, 71–83.
- Fukou, L., Baolin, L., LiWeijie, and Jaganathan, G.K. (2012). Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Devitrification of PEG-600 Cryoprotectant. *Energy Procedia* 16, 796–801.
- García, E.V., Hamdi, M., Barrera, A.D., Sánchez-Calabuig, M.J., Gutiérrez-Adán, A., and Rizos, D. (2017). Bovine embryo-oviduct interaction in vitro reveals an early cross talk mediated by BMP signaling. *Reproduction* 153, 631–643.
- Georges, M., and Massey, J.M. (1991). Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology (USA)*.
- Ghanem, N., Ha, A.-N., Fakruzzaman, M., Bang, J.-I., Lee, S.-C., and Kong, I.-K. (2014). Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology* 82, 238–250.
- Gilchrist, R., Lane, M., and Thompson, J. (2008). Oocyte-secreted factors: Regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 14, 159–177.
- Goissis, M.D., and Cibelli, J.B. (2014a). Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 962–970.
- Goissis, M.D., and Cibelli, J.B. (2014b). Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. *Biology of Reproduction* 90.
- Gómez, E., Carrocera, S., Uzbekova, S., Martín, D., Murillo, A., Alonso-Guervós, M., Goyache, F., and Muñoz, M. (2017). Protein in culture and endogenous lipid interact with embryonic stages in vitro to alter calf birthweight after embryo vitrification and warming. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 1932–1943.
- Gómez, E., Carrocera, S., Martín, D., Pérez-Jánez, J.J., Prendes, J., Prendes, J.M., Vázquez, A., Murillo, A., Gimeno, I., and Muñoz, M. (2020). Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology* 146, 39–47.

- González, A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. (1994). Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* *41*, 1631–1642.
- González Hernández, Y., and Fischer, R.W. (2007). Serum-free culturing of mammalian cells--adaptation to and cryopreservation in fully defined media. *ALTEX* *24*, 110–116.
- González-Serrano, A.F., Pirro, V., Ferreira, C.R., Oliveri, P., Eberlin, L.S., Heinzmann, J., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., and Cooks, R.G. (2013). Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. *PLoS ONE* *8*, e74981.
- Goszczynski, D.E., Cheng, H., Demyda-Peyrás, S., Medrano, J.F., Wu, J., and Ross, P.J. (2019). In vitro breeding: application of embryonic stem cells to animal production†. *Biol Reprod* *100*, 885–895.
- Gumber, D.J. (2014). The Effects of Different Cryopreservation Techniques on the Survival Rate of In Vitro Produced (IVP) and Biopsied Bovine Blastocysts (San Luis Obispo, California, USA: Faculty of the Department of Animal Science California Polytechnic State University).
- Guyader-Joly, C., Gonzalez, C., Bourhis, D.L., Moulin, B., Heyman, Y., Humblot, P., Guyader-Joly, C., Gonzalez, C., Bourhis, D.L., Moulin, B., et al. (2008). 135 PREGNANCY RATES AFTER SINGLE DIRECT TRANSFER OF BIOPSIED FROZEN–THAWED BOVINE EMBRYOS ACCORDING TO QUALITY. *Reprod. Fertil. Dev.* *21*, 167–167.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* *9*, 1–32.
- Hamazaki, N., Kyogoku, H., Araki, H., Miura, F., Horikawa, C., Hamada, N., Shimamoto, S., Hikabe, O., Nakashima, K., Kitajima, T.S., et al. (2021). Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors. *Nature* *589*, 264–269.
- Hansen, P.J. (2020). The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J Anim Sci* *98*, skaa288.
- Hashimoto, S., Minami, N., Takakura, R., Yamada, M., Imai, H., and Kashima, N. (2000). Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* *57*, 353–360.
- Hasler, J.F. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci* *79*, 245–264.
- Hasler, J.F. (2010). Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* *22*, 119–125.
- 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.
- Havlicek, V., Kuzmany, A., Cseh, S., Brem, G., and Besenfelder, U. (2010). The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* *45*, 832–837.
- Hayashi, T., Kansaku, K., Abe, T., Ueda, S., and Iwata, H. (2019). Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. *Anim Sci J* *90*, 849–856.

- Hesgrove, C., and Boothby, T.C. (2020). The biology of tardigrade disordered proteins in extreme stress tolerance. *Cell Commun Signal* 18, 178.
- Hohos, N.M., Elliott, E.M., Cho, K.J., Lin, I.S., Rudolph, M.C., and Skaznik-Wikiel, M.E. (2020). High-fat diet-induced dysregulation of ovarian gene expression is restored with chronic omega-3 fatty acid supplementation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 499, 110615.
- Holm, P., Shukri, N.N., Vajta, G., Booth, P., Bendixen, C., and 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.
- Holm, P., Booth, P.J., and 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* 123, 553–565.
- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 31, 137–143.
- Hoyos-Marulanda, V., Alves, B.S., Rosa, P.R.A., Vieira, A.D., Gasperin, B.G., Mondadori, R.G., and Lucia, T. (2019). Effects of polyunsaturated fatty acids on the development of pig oocytes in vitro following parthenogenetic activation and on the lipid content of oocytes and embryos. *Animal Reproduction Science* 205, 150–155.
- Huang, J. (2007). High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. - PubMed - NCBI.
- Hübner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., Boiani, M., and Schöler, H.R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251–1256.
- Humblot, P., Le Bourhis, D., Fritz, S., Colleau, J.J., Gonzalez, C., Guyader Joly, C., Malafosse, A., Heyman, Y., Amigues, Y., Tissier, M., et al. (2010). Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Vet Med Int* 2010, 192787.
- Hunter, R.H.F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87, 244–255.
- Inaba, Y., Miyashita, S., Somfai, T., Geshi, M., Matoba, S., and Nagai, T. (2016). Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. - PubMed - NCBI.
- Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Mossa, F., Lonergan, P., and Evans, A.C.O. (2011). Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod Fertil Dev* 23, 1–14.
- Jenko, J., Gorjanc, G., Cleveland, M.A., Varshney, R.K., Whitelaw, C.B.A., Woolliams, J.A., and Hickey, J.M. (2015). Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. *Genetics Selection Evolution* 47, 55.
- Kang, J.-T., Moon, J.H., Choi, J.-Y., Park, S.J., Kim, S.J., Saadeldin, I.M., and Lee, B.C. (2016). Effect of Antioxidant Flavonoids (Quercetin and Taxifolin) on In vitro Maturation of Porcine Oocytes. *Asian-Australas J Anim Sci* 29, 352–358.

- Karlsson, J.O., and Toner, M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17, 243–256.
- Karlsson, J.O., Cravalho, E.G., Borel Rinkes, I.H., Tompkins, R.G., Yarmush, M.L., and Toner, M. (1993). Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. *Biophys. J.* 65, 2524–2536.
- Karow, A. (2001). *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists.*
- Karow, A.M., and Webb, W.R. (1965). Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* 2, 99–108.
- Kessler, M., Hoffmann, K., Brinkmann, V., Thieck, O., Jackisch, S., Toelle, B., Berger, H., Mollenkopf, H.-J., Mangler, M., Sehouli, J., et al. (2015). The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun* 6, 8989.
- Khan, D.R., Dubé, D., Gall, L., Peynot, N., Ruffini, S., Laffont, L., Le Bourhis, D., Degrelle, S., Jouneau, A., and Duranthon, V. (2012). Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. *PLoS ONE* 7, e34110.
- Khurana, N.K., and Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.* 62, 847–856.
- Kim, J.Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M., and Fukui, Y. (2001). Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122, 131–138.
- Koga, F., Kitagami, S., Izumi, A., Uemura, T., Takayama, O., Koga, T., and Mizoguchi, T. (2020). Relationship between nutrition and reproduction. *Reprod. Med. Biol.* 19, 254–264.
- Kölle, S., Dubielzig, S., Reese, S., Wehrend, A., König, P., and Kummer, W. (2009). Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol. Reprod.* 81, 267–274.
- Lamy, J., Liere, P., Pianos, A., Aprahamian, F., Mermillod, P., and Saint-Dizier, M. (2016). Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology* 86, 1409–1420.
- Lamy, J., Gatien, J., Dubuisson, F., Nadal-Desbarats, L., Salvetti, P., Mermillod, P., and Saint-Dizier, M. (2018). Metabolomic profiling of bovine oviductal fluid across the oestrous cycle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Reprod. Fertil. Dev.*
- Lane, M., and Gardner, D.K. (1997). Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 109, 153–164.
- Leão, B.C.S., Rocha-Frigoni, N.A.S., Cabral, E.C., Franco, M.F., Ferreira, C.R., Eberlin, M.N., Filgueiras, P.R., and Mingoti, G.Z. (2015). Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote* 23, 732–741.
- Leão, B.C.S., Rocha-Frigoni, N.A.S., Nogueira, É., Cabral, E.C., Ferreira, C.R., Eberlin, M.N., Accorsi, M.F., Neves, T.V., and Mingoti, G.Z. (2017). Membrane lipid profile of in vitro-produced embryos is affected by vitrification but not by long-term dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids for oocyte donor beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 1217–1230.

- Leaver, M., and Wells, D. (2020). Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Hum Reprod Update* 26, 16–42.
- Leibo, S.P. (1986). Cryobiology: Preservation of Mammalian Embryos. In *Genetic Engineering of Animals: An Agricultural Perspective*, J.W. Evans, A. Hollaender, and C.M. Wilson, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 251–272.
- Leidenfrost, S., Boelhauve, M., Reichenbach, M., Güngör, T., Reichenbach, H.-D., Sinowatz, F., Wolf, E., and Habermann, F.A. (2011). Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. *PLoS One* 6, e22121.
- Li, S., and Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J. Endocrinol.* 232, R1–R26.
- Li, L., Zheng, P., and Dean, J. (2010). Maternal control of early mouse development. *Development* 137, 859–870.
- Lim, K.T., Jang, G., Ko, K.H., Lee, W.W., Park, H.J., Kim, J.J., Lee, S.H., Hwang, W.S., Lee, B.C., and Kang, S.K. (2007). Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* 67, 293–302.
- Lindbloom, S.M., Farmerie, T.A., Clay, C.M., Seidel, G.E., and Carnevale, E.M. (2008). Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. *Anim Reprod Sci* 103, 187–192.
- Liu, L., Yin, T.-L., Chen, Y., Li, Y., Yin, L., Ding, J., Yang, J., and Feng, H.-L. (2019). Follicular dynamics of glycerophospholipid and sphingolipid metabolisms in polycystic ovary syndrome patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 185, 142–149.
- Lonergan, P., Pedersen, H.G., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, P.D., Fair, T., Evans, A., and 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., Fair, T., Forde, N., and Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology* 86, 270–277.
- Lopera-Vásquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., Calle, A., Redruello, A., López-Martín, S., Gutierrez-Adán, A., Yañez-Mó, M., et al. (2016). Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLOS ONE* 11, e0148083.
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Lloreda, V., Coy, P., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., and Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 621–629.
- López-Damián, E.P., Jiménez-Medina, J.A., Alarcón, M.A., Lammoglia, M.A., Hernández, A., Galina, C.S., and Fiordeliso, T. (2019). Cryopreservation induces higher oxidative stress levels in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*. *Theriogenology* 143, 74–81.
- Lovelock, J.E. (1953a). The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10, 414–426.
- Lovelock, J.E. (1953b). The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 11, 28–36.

- Lundbaek, J.A., and Andersen, O.S. (1994). Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J Gen Physiol* 104, 645–673.
- Ma, Y.-Y., Chen, H.-W., and Tzeng, C.-R. (2017). Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *J Ovarian Res* 10, 47.
- Mapletoft, R.J., and Bó, G.A. (2011). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev* 24, 278–283.
- Marei, W.F.A., Wathes, D.C., and Fouladi-Nashta, A.A. (2010). Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. - PubMed - NCBI.
- Marei, W.F.A., De Bie, J., Mohey-Elsaeed, O., Wydooghe, E., Bols, P.E.J., and Leroy, J.L.M.R. (2017). Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine cumulus-oocyte complexes matured under lipotoxic conditions in vitro. *Biol. Reprod.* 96, 1181–1196.
- Marei et al., W.F.A. (2016). Effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality depends on the type of major fatty acid in the diet. - PubMed - NCBI.
- Marques, C.C., Santos-Silva, C., Rodrigues, C., Matos, J.E., Moura, T., Baptista, M.C., Horta, A.E.M., Bessa, R.J.B., Alves, S.P., Soveral, G., et al. (2018). Bovine oocyte membrane permeability and cryosurvival: Effects of different cryoprotectants and calcium in the vitrification media. *Cryobiology* 81, 4–11.
- Marsico, T.V., de Camargo, J., Valente, R.S., and Sudano, M.J. (2019). Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Anim Reprod* 16, 423–439.
- Martínez, A.G., Brogliatti, G.M., Valcarcel, A., and de las Heras, null (2002). Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology* 58, 963–972.
- Martinez-Lopez, N., and Singh, R. (2015). Autophagy and Lipid Droplets in the Liver. *Annu. Rev. Nutr.* 35, 215–237.
- Maskarinec, S.A., Wu, G., and Lee, K.Y.C. (2005). Membrane sealing by polymers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1066, 310–320.
- Mattos, R., Staples, C.R., Arteché, A., Wiltbank, M.C., Diaz, F.J., Jenkins, T.C., and Thatcher, W.W. (2004). The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF₂α, milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87, 921–932.
- Mazur, P. (1963). Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 47, 347–369.
- Mazur, P. (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168, 939–949.
- Mazur, P., Seki, S., Pinn, I.L., Kleinhans, F.W., and Edashige, K. (2005). Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology* 51, 29–53.
- Memili, E., Dominko, T., and First, N.L. (1998). Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 36–41.

- Men, H., Agca, Y., Riley, L.K., and Critser, J.K. (2006). Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* *66*, 2008–2016.
- Merton, J.S., de Roos, A.P.W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L. a. M., and Dieleman, S.J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* *59*, 651–674.
- Meryman, H.T. (1968). Modified Model for the Mechanism of Freezing Injury in Erythrocytes. *Nature* *218*, 333–336.
- Meyers-Brown, G., Bidstrup, L.A., Famula, T.R., Colgin, M., and Roser, J.F. (2011). Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. *Anim Reprod Sci* *128*, 52–59.
- Mihalas, B.P., De Iulius, G., Redgrove, K.A., McLaughlin, E.A., and Brett, N. (2017). The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal contributes to oxidative stress-mediated deterioration of the ageing oocyte. - PubMed - NCBI.
- Minami, S., Yamamoto, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Namba, T., Matsuda, J., Kimura, T., Kaimori, J.-Y., Matsui, I., Hamano, T., et al. (2017). Lipophagy maintains energy homeostasis in the kidney proximal tubule during prolonged starvation. *Autophagy* *13*, 1629–1647.
- Miyamoto, J., Hasegawa, S., Kasubuchi, M., Ichimura, A., Nakajima, A., and Kimura, I. (2016). Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors. *Int J Mol Sci* *17*, 450.
- Moallem, U., Shafran, A., Zachut, M., Dekel, I., Portnick, Y., and Arieli, A. (2013). Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction* *146*, 603–614.
- Moloughney, J.G., and Weisleder, N. (2012). Poloxamer 188 (p188) as a membrane resealing reagent in biomedical applications. *Recent Pat Biotechnol* *6*, 200–211.
- Monniaux, D., Caraty, A., Clement, F., Dalbies-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., and Uzbekova, S. (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRA Productions Animales* *22*, 59.
- Moore, K., and Thatcher, W.W. (2006). Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci* *89*, 1254–1266.
- Moreira da Silva, F., and Metelo, R. (2005). Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. *Reprod Domest Anim* *40*, 205–209.
- Mori, M., Hayashi, T., Isozaki, Y., Takenouchi, N., and Sakatani, M. (2015). Heat shock decreases the embryonic quality of frozen-thawed bovine blastocysts produced in vitro. *J Reprod Dev* *61*, 423–429.
- Moussa, M., Yang, C.-Y., Zheng, H.-Y., Li, M.-Q., Yu, N.-Q., Yan, S.-F., Huang, J.-X., and Shang, J.-H. (2019). Vitrification alters cell adhesion related genes in pre-implantation buffalo embryos: Protective role of β -mercaptoethanol. *Theriogenology* *125*, 317–323.

- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., and Alberio, R.H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65, 1551–1562.
- Muldrew, K., and McGann, L.E. (1990). Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J* 57, 525–532.
- Muldrew, K., and McGann, L.E. (1994). The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys. J.* 66, 532–541.
- Mullani, N., Singh, M.K., Sharma, A., Rameshbabu, K., Manik, R.S., Palta, P., Singla, S.K., and Chauhan, M.S. (2016). Caspase-9 inhibitor Z-LEHD-FMK enhances the yield of in vitro produced buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-implantation embryos and alters cellular stress response. *Res Vet Sci* 104, 4–9.
- Murillo-Ríos, A., Maillo, V., Muñoz, M., Gutiérrez-Adán, A., Carrocera, S., Martín-González, D., Fernandez-Buznego, A., and Gómez, E. (2017). Short- and long-term outcomes of the absence of protein during bovine blastocyst formation in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 1064–1073.
- Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L.K., and Silver, D.L. (2014). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503–506.
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., et al. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell* 16, 398–410.
- Nuttinck, F., Jouneau, A., Charpigny, G., Hue, I., Richard, C., Adenot, P., Ruffini, S., Laffont, L., Chebrout, M., Duranthon, V., et al. (2017). Prosurvival effect of cumulus prostaglandin G/H synthase 2/prostaglandin2 signaling on bovine blastocyst: impact on in vivo posthatching development. *Biol. Reprod.* 96, 531–541.
- Oldenhof, H., Zhang, M., Narten, K., Bigalk, J., Sydykov, B., Wolkers, W.F., and Sieme, H. (2017). Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging. *Biol Reprod* 97, 892–901.
- Oliver, A.E., Hinch, D.K., and Crowe, J.H. (2002). Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131, 515–525.
- Orsi, N.M., and Leese, H.J. (2001). Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. *Mol Reprod Dev* 59, 44–53.
- Ortega, M.S., Kelleher, A.M., O’Neil, E., Benne, J., Cecil, R., and Spencer, T.E. (2020a). *NANOG* is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 87, 152–160.
- Ortega, M.S., Kelleher, A.M., O’Neil, E., Benne, J., Cecil, R., and Spencer, T.E. (2020b). *NANOG* is required to form the epiblast and maintain pluripotency in the bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 87, 152–160.

- Oseikria, M., Elis, S., Maillard, V., Corbin, E., and Uzbekova, S. (2016). N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. *Theriogenology* *85*, 1625-1634.e2.
- Palasz, A.T., Thundathil, J., De La Fuente, J., and Mapletoft, R.J. (2000). Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. *Cryobiology* *41*, 35–42.
- Pampfer, S. (2000). Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages--a review. *Placenta* *21 Suppl A*, S3-10.
- Pan, B., and Li, J. (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reprod Biol Endocrinol* *17*, 8.
- Panyaboriban, S., Tharasanit, T., Chankitisakul, V., Swangchan-Uthai, T., and Techakumphu, M. (2018). Treatment with chemical delipidation forskolin prior to cryopreservation improves the survival rates of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos indicus*) in vitro produced embryos. *Cryobiology* *84*, 46–51.
- Pereira, R.M., and Marques, C.C. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. - PubMed - NCBI.
- Pero, M.E., Zullo, G., Esposito, L., Iannuzzi, A., Lombardi, P., De Canditiis, C., Neglia, G., and Gasparini, B. (2018). Inhibition of apoptosis by caspase inhibitor Z-VAD-FMK improves cryotolerance of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* *108*, 127–135.
- Petit, H.V., and Twagiramungu, H. (2006). Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology* *66*, 1316–1324.
- Pomar, F.J.R., Teerds, K.J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar, B., and Roelen, B. a. J. (2005). Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology* *63*, 2254–2268.
- Ponsart, C., Le Bourhis, D., Knijn, H., Fritz, S., Guyader-Joly, C., Otter, T., Lacaze, S., Charreaux, F., Schibler, L., Dupassieux, D., et al. (2013). Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* *26*, 12–21.
- Qin, H., Hejna, M., Liu, Y., Percharde, M., Wossidlo, M., Blouin, L., Durruthy-Durruthy, J., Wong, P., Qi, Z., Yu, J., et al. (2016). YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Rep* *14*, 2301–2312.
- Ramos-Ibeas, P., Heras, S., Gómez-Redondo, I., Planells, B., Fernández-González, R., Pericuesta, E., Laguna-Barraza, R., Pérez-Cerezales, S., and Gutiérrez-Adán, A. (2019). Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev* *86*, 1292–1306.
- Ramos-Ibeas, P., Gimeno, I., Cañón-Beltrán, K., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., and Gómez, E. (2020). Senescence and Apoptosis During in vitro Embryo Development in a Bovine Model. *Front Cell Dev Biol* *8*, 619902.
- Ren, Z., Chen, L., Wang, Y., Wei, X., Zeng, S., Zheng, Y., Gao, C., and Liu, H. (2019). Activation of the Omega-3 Fatty Acid Receptor GPR120 Protects against Focal Cerebral Ischemic Injury by Preventing Inflammation and Apoptosis in Mice. *J Immunol* *202*, 747–759.

- Residiwati, G., Azari-Dolatabad, N., Tuska, H.S.A., Sidi, S., Van Damme, P., Benedetti, C., Montoro, A.F., Luceno, N.L., Budiono, null, Pavani, K.C., et al. (2021). Effect of lycopene supplementation to bovine oocytes exposed to heat shock during in vitro maturation. *Theriogenology* 173, 48–55.
- Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, J.P., and Heyman, Y. (1995). Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil* 103, 115–120.
- Rieger, D., Luciano, A.M., Modena, S., Pocar, P., Lauria, A., and 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. *J Reprod Fertil* 112, 123–130.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* 61, 234–248.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68, 236–243.
- Roelen, B.A.J. (2019). Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. *Reprod Fertil Dev* 32, 98–103.
- Rossi, C.R., Bridgman, C.R., and Kiesel, G.K. (1980). Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am J Vet Res* 41, 1680–1681.
- Rubessa, M., Ambrosi, A., Gonzalez-Pena, D., Polkoff, K.M., Denmark, S.E., and Wheeler, M.B. (2016). Non-invasive analysis of bovine embryo metabolites during *in vitro* embryo culture using nuclear magnetic resonance. *Bioengineering* 2016, Vol. 3, Pages 538-551.
- Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C., and Suzuki, T. (1996). Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33, 291–299.
- Saint-Dizier, M., Schoen, J., Chen, S., Banliat, C., and Mermillod, P. (2019). Composing the Early Embryonic Microenvironment: Physiology and Regulation of Oviductal Secretions. *Int J Mol Sci* 21, E223.
- Sanches, B.V., Marinho, L.S.R., Filho, B.D.O., Pontes, J.H.F., Basso, A.C., Meirinhos, M.L.G., Silva-Santos, K.C., Ferreira, C.R., and Seneda, M.M. (2013). Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology* 80, 372–377.
- Sanmartín-Suárez, C., Soto-Otero, R., Sánchez-Sellero, I., and Méndez-Álvarez, E. (2011). Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods* 63, 209–215.
- Sata, R., Tsujii, H., Abe, H., Yamashita, S., and Hoshi, H. (1999). Fatty Acid Composition of Bovine Embryos Cultured in Serum-Free and Serum-Containing Medium during Early Embryonic Development. *Journal of Reproduction and Development* 45, 97–103.
- Schefers, J.M., and Weigel, K.A. (2012). Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. *Animal Frontiers* 2, 4–9.

- Sehati, R., Kazemi, P., Zandi, G., Mahdavinezhad, F., Sarmadi, F., Fayazi, S., Hajarlan, H., and Dashtizad, M. (2019). Different Origin, Different Response: Gene Expression Pattern in Collapsed Vitrified Blastocyst. *Reprod Biol* 19, 158–164.
- Seidel, G.E. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. - PubMed - NCBI.
- Shamonki, M.I., Jin, H., Haimowitz, Z., and Liu, L. (2016). Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril* 106, 1312–1318.
- Shamsuddin, M., and Rodriguez-Martinez, H. (1994). Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *Zentralbl Veterinarmed A* 41, 307–316.
- Shi, G., and Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther* 1, 39.
- Silvestri, G., Canedo-Ribeiro, C., Serrano-Albal, M., Labrecque, R., Blondin, P., Larmer, S.G., Marras, G., Tutt, D.A.R., Handyside, A.H., Farré, M., et al. (2021). Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Live Birth Rates with In Vitro Produced Bovine Embryos: A Blind Retrospective Study. *Cells* 10, 2284.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135.
- Somfai, T., NAKAI, M., TANIHARA, F., NOGUCHI, J., KANEKO, H., KASHIWAZAKI, N., EGERSEGI, I., NAGAI, T., and KIKUCHI, K. (2013). Comparison of Ethylene Glycol and Propylene Glycol for the Vitrification of Immature Porcine Oocytes. *J Reprod Dev* 59, 378–384.
- Sprícigo, J.F.W., Diogenes, M.N., Leme, L.O., Guimaraes, A.L., Muterlle, C.V., Silva, B.D.M., and Dode, M. a. N. (2015). Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warm... - PubMed - NCBI.
- Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132, 2093–2102.
- Sudano, M.J., Santos, V.G., Tata, A., Ferreira, C.R., Paschoal, D.M., Machado, R., Buratini, J., Eberlin, M.N., and Landim-Alvarenga, F.D.C. (2012). Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biol Reprod* 87, 130.
- Sudano, M.J., Rascado, T.D.S., Tata, A., Belaz, K.R.A., Santos, V.G., Valente, R.S., Mesquita, F.S., Ferreira, C.R., Araújo, J.P., Eberlin, M.N., et al. (2016). Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology* 86, 472-484.e1.
- Sudano et al., M.J. (2011). Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. - PubMed - NCBI.
- Surani, M.A., and Barton, S.C. (1977a). Trophoblastic vesicles of preimplantation blastocysts can enter into quiescence in the absence of inner cell mass. *J Embryol Exp Morphol* 39, 273–277.

- Surani, M.A., and Barton, S.C. (1977b). Trophoblastic vesicles of preimplantation blastocysts can enter into quiescence in the absence of inner cell mass. *J Embryol Exp Morphol* *39*, 273–277.
- Suzuki, T., Takagi, M., Yamamoto, M., Boediono, A., Saha, S., Sakakibara, H., and Oe, M. (1993). Pregnancy rate and survival in culture of in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology* *40*, 651–659.
- Szabó, E.R., Plangár, I., Tóké, T., Mán, I., Polanek, R., Kovács, R., Fekete, G., Szabó, Z., Csenki, Z., Baska, F., et al. (2016). l-Alpha Glycerylphosphorylcholine as a Potential Radioprotective Agent in Zebrafish Embryo Model. *Zebrafish* *13*, 481–488.
- Szurek, E.A., and Eroglu, A. (2011). Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One* *6*, e27604.
- Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneda, M., Geshi, M., Nagai, T., and Manabe, N. (2013). Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* *25*, 589–599.
- Teixeira, M., Commin, L., Gavin-Plagne, L., Bruyère, P., Buff, S., and Joly, T. (2018). Rapid cooling of rabbit embryos in a synthetic medium. *Cryobiology* *85*, 113–119.
- Thompson, J.G. (1996). Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* *45*, 27–40.
- Thompson, J.G., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Cox, C.I., and Leese, H.J. (1996). Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* *106*, 299–306.
- Tian, S.-J., Yan, C.-L., Yang, H.-X., Zhou, G.-B., Yang, Z.-Q., and Zhu, S.-E. (2007). Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Anim Reprod Sci* *101*, 365–371.
- Torres, A.C., Boruszewska, D., Batista, M., Kowalczyk-Zieba, I., Diniz, P., Sinderewicz, E., Saulnier-Blache, J.S., Woclawek-Potocka, I., and Lopes-da-Costa, L. (2014). Lysophosphatidic acid signaling in late cleavage and blastocyst stage bovine embryos. *Mediators Inflamm* *2014*, 678968.
- Trigal, B., Muñoz, M., Gómez, E., Caamaño, J.N., Martín, D., Carrocera, S., Casais, R., and Díez, C. (2013). Cell counts and survival to vitrification of bovine in vitro produced blastocysts subjected to sublethal high hydrostatic pressure. *Reprod. Domest. Anim.* *48*, 200–206.
- Uhlmann, D.R. (1972). A kinetic treatment of glass formation. *Journal of Non-Crystalline Solids* *7*, 337–348.
- Vajta, G., and Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* *65*, 236–244.
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., and Callesen, H. (1997). Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. - PubMed - NCBI.
- Van Soom, A., Boerjan, M., Ysebaert, M.T., and De Kruif, A. (1996). Cell allocation to the inner cell mass and the trophoblast in bovine embryos cultured in two different media. *Mol Reprod Dev* *45*, 171–182.

- Van Soom, A., Boerjan, M.L., Bols, P.E., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M., and de Kruif, A. (1997a). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* 57, 1041–1049.
- Van Soom, A., Boerjan, M.L., Bols, P.E., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M., and de Kruif, A. (1997b). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* 57, 1041–1049.
- Velthut, A., Zilmer, M., Zilmer, K., Kaart, T., Karro, H., and Salumets, A. (2013). Elevated blood plasma antioxidant status is favourable for achieving IVF/ICSI pregnancy. - PubMed - NCBI.
- Viudes De Castro, M.P., Cortell, C., and Vicente, J.S. (2010). Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology* 74, 1623–1628.
- Voelkel, S.A., and Hu, Y.X. (1992). Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37, 687–697.
- Wallgren, M., Beranova, L., Pham, Q.D., Linh, K., Lidman, M., Procek, J., Cyprych, K., Kinnunen, P.K.J., Hof, M., and Gröbner, G. (2013). Impact of oxidized phospholipids on the structural and dynamic organization of phospholipid membranes: a combined DSC and solid state NMR study. *Faraday Discuss* 161, 499–513; discussion 563–589.
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., Tan, D., and Liu, G. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 101, 577–586.
- Wang, W., Yang, H., Johnson, D., Gensler, C., Decker, E., and Zhang, G. (2017). Chemistry and biology of ω -3 PUFA peroxidation-derived compounds. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 132, 84–91.
- Wang, Y., Xie, T., Zhang, D., and Leung, P.S. (2019). GPR120 protects lipotoxicity-induced pancreatic β -cell dysfunction through regulation of PDX1 expression and inhibition of islet inflammation. *Clin Sci (Lond)* 133, 101–116.
- Welch, A.A., Shakya-Shrestha, S., Lentjes, M.A.H., Wareham, N.J., and Khaw, K.-T. (2010). Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the product-precursor ratio [corrected] of α -linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 92, 1040–1051.
- Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R.A., Sasaki, H., and Ralston, A. (2014a). HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet* 10, e1004618.
- Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R.A., Sasaki, H., and Ralston, A. (2014b). HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet* 10, e1004618.
- Wolfe, J., and Bryant, G. (2001). Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration* 13.
- Wooldridge, L.K., Johnson, S.E., Cockrum, R.R., and Ealy, A.D. (2019a). Interleukin-6 requires JAK to stimulate inner cell mass expansion in bovine embryos. *Reproduction* 158, 303–312.

- Wooldridge, L.K., Johnson, S.E., Cockrum, R.R., and Ealy, A.D. (2019b). Interleukin-6 requires JAK to stimulate inner cell mass expansion in bovine embryos. *Reproduction* *158*, 303–312.
- Wozniak, K.L., and Carlson, A.E. (2020). Ion channels and signaling pathways used in the fast polyspermy block. *Mol Reprod Dev* *87*, 350–357.
- Wu, G., Gentile, L., Fuchikami, T., Sutter, J., Psathaki, K., Esteves, T.C., Araúzo-Bravo, M.J., Ortmeier, C., Verberk, G., Abe, K., et al. (2010). Initiation of trophoctoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Development* *137*, 4159–4169.
- Younis, A., G Brackett, B., and Fayrer-Hosken, R. (1989). Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research* *23*, 189–201.
- Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., et al. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* *150*, 780–791.
- Zander-Fox, D., Lane, M., and Hamilton, H. (2013). Slow freezing and vitrification of mouse morula and early blastocysts. *J Assist Reprod Genet* *30*, 1091–1098.
- Zangirolamo, A.F., Morotti, F., Silva, N.C. da, Sanches, T.K., and Seneda, M.M. (2018). Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. *Animal Reproduction* *15*, 310–315.
- Zarezadeh, R., Mehdizadeh, A., Leroy, J.L.M.R., Nouri, M., Fayezi, S., and Darabi, M. (2019). Action mechanisms of n-3 polyunsaturated fatty acids on the oocyte maturation and developmental competence: Potential advantages and disadvantages. *J. Cell. Physiol.* *234*, 1016–1029.
- Zhang, J.Y., Jiang, Y., Lin, T., Kang, J.W., Lee, J.E., and Jin, D.I. (2015). Lysophosphatidic acid improves porcine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* *82*, 66–77.
- Zhang, M., Oldenhof, H., Sieme, H., and Wolkers, W.F. (2016). Freezing-induced uptake of trehalose into mammalian cells facilitates cryopreservation. *Biochim Biophys Acta* *1858*, 1400–1409.
- Zhang, M., Oldenhof, H., Sieme, H., and Wolkers, W.F. (2017). Combining endocytic and freezing-induced trehalose uptake for cryopreservation of mammalian cells. *Biotechnol Prog* *33*, 229–235.
- Zhao, X.-M., Du, W.-H., Hao, H.-S., Wang, D., Qin, T., Liu, Y., and Zhu, H.-B. (2012). Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* *79*, 445–450.
- Zheng, L., Lin, Y., Lu, S., Zhang, J., and Bogdanov, M. (2017). Biogenesis, transport and remodeling of lysophospholipids in Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* *1862*, 1404–1413.

Titre : Cryoconservation d'embryons bovins produits *in vitro* et biopsiés

Résumé

Aujourd'hui la cryoconservation de l'embryon bovin est primordiale pour assurer sa préservation dans l'attente de sa valorisation. Cependant, la qualité des embryons produits *in vitro* est inférieure à celle de ceux produits *in vivo* ne permettant pas l'obtention de taux de gestation équivalents. Lors du processus de congélation, les membranes, majoritairement composées de lipides, subissent des contraintes physiques et chimiques pouvant aboutir à une lyse des cellules embryonnaires. Ainsi, afin d'améliorer la qualité des embryons bovins produits *in vitro* et biopsiés, deux tâches ont été menées en parallèle : (1) l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques sur le profil lipidique des embryons produits *in vitro* et la modulation de ce profil par l'ajout d'acides gras de type oméga 3 avec pour objectifs d'augmenter la fluidité membranaire et de diminuer la cryosensibilité des embryons; (2) l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques sur l'intérêt du CRYO3, dans la formulation de milieux de cryoconservation synthétiques, pour la cryoconservation des embryons bovins. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que le profil lipidique des embryons est fortement impacté par le processus de production *in vitro* et les protocoles de cryoconservation. La modulation du profil lipidique par l'ajout d'oméga 3 n'impacte pas le développement et la cryosurvie des embryons mais semble bénéfique à l'obtention d'embryons de meilleure qualité. Enfin, le CRYO3 est un candidat intéressant permettant de se passer des milieux habituels, contenant des dérivés de produits animaux, tout en améliorant la cryosurvie des embryons.

Mots clés : Profil lipidique, embryons, cryoconservation, culture *in vitro*, biopsie, bovin

Title: Cryopreservation of bovine embryos *in vitro* produced and biopsied

Abstract

Today, cryopreservation of bovine embryo is essential to ensure its preservation while awaiting their valuation. However, the quality of the *in vitro* produced embryos is inferior to those produced *in vivo*, resulting in different gestation rates. During the freezing process, the membranes, mainly composed of lipids, undergo physical and chemical stress which can lead to lysis of embryonic cells. In this way, in order to improve the quality of *in vitro* produced bovine embryos, with the ambition to increase the pregnancy rate after transfer, two tasks were carried out in parallel: (1) The acquisition of new scientific knowledge on the lipid profile of *in vitro* produced bovine embryos and the modulation of the lipid profile by the addition of omega 3 fatty acid with the objectives of increasing membrane fluidity and reducing the embryo cryosensitivity; (2) the acquisition of new scientific knowledge on the interest of CRYO3, in the formulation of synthetic media for the cryopreservation of *in vitro* produced and biopsied bovine embryos. This work has demonstrated that the lipid profile of embryos is strongly impacted by the *in vitro* development and cryopreservation protocol. Modulating the lipid profile by adding omega 3 does not impact the development and cryosurvival of embryos but appears to be beneficial for improving embryonic quality. Finally, CRYO3 is an interesting candidate, making it possible to dispense with the usual media, containing derivatives of animal products, while improving the cryosurvival of the embryos.

Keywords: Lipid profile, embryos, cryopreservation, *in vitro* culture, biopsy, cattle

Adresse du laboratoire :

Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP ICE 2021.A104, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France