



Reprogrammation embryonnaire et somatique au moment de la mise en route du génome dans l'embryon de bovin

Daulat-Raheem D.-R. Khan

► To cite this version:

Daulat-Raheem D.-R. Khan. Reprogrammation embryonnaire et somatique au moment de la mise en route du génome dans l'embryon de bovin. Biologie de la reproduction. Université Paris Sud - Paris 11, 2011. Français. NNT: . tel-02808631

HAL Id: tel-02808631

<https://hal.inrae.fr/tel-02808631>

Submitted on 6 Jun 2020

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.



U N I V E R S I T É P A R I S - S U D 1 1

Ecole Doctorale: Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie

(BIO-SigNE)

THESE

Pour obtenir le diplôme de

Docteur en Sciences de l'Université Paris-Sud

Discipline: Reproduction - Développement

Présenté et soutenue publiquement par

Daulat Raheem KHAN

19 Octobre 2011

**Reprogrammation embryonnaire et somatique au moment
de la mise en route du génome dans
l'embryon bovin**

Sous la direction de

Véronique DURANTHON

Composition du jury

Professeur Gérard TACHDJIAN	Professeur de l'Université Paris XI	Président
Patrick LONERGAN	Professeur de l'Université College Dublin	Rapporteur
Bertrand PAIN	Directeur de Recherche, INSERM, Paris	Rapporteur
Michel COHEN-TANOUDJI	Directeur de Recherche l'Institut Pasteur	Examineur
Brigitte MARQUANT-LE GUIENNE	Ingenieur de Recherche, UNCEIA	Examinatrice
Véronique DURANTHON	Directeur de Recherche, INRA	Directeur de Thèse

Lors de la fécondation, le sperme et l'ovule s'unissent pour former un zygote totipotent. Initialement, le zygote est transcriptionnellement inactif. Au cours des premiers clivages a lieu la mise en route du génome embryonnaire (EGA) et le développement passe alors sous le contrôle de l'information embryonnaire (au stade 8-16-cellules chez le bovin). Cette transition d'un contrôle maternel à un contrôle embryonnaire est appelée « maternal to embryonic transition (MET) ». De la même façon, lors du transfert nucléaire (clonage), un noyau de cellule somatique placé dans un ovocyte énucléé devient totipotent. Ce processus est appelé « reprogrammation nucléaire somatique? ». En fait, la reprogrammation nucléaire lors du clonage est équivalente à la MET, toutefois, le clonage est très peu efficace. Les objectifs de cette étude chez les bovins sont a) d'explorer le processus de reprogrammation lors de la MET dans des embryons fécondés in vitro (FIV) et b) d'estimer l'efficacité de la reprogrammation génique après le transfert nucléaire lors du clonage. Nous émettons l'hypothèse que l'acquisition d'un profil d'expression génique correct pourrait être prédictif d'un potentiel de développement à terme de l'embryon, et pourrait être évalué dès juste après l'activation du génome embryonnaire (EGA) chez les bovins. Nous avons développé notre travail selon deux axes a) des analyses globales d'expression génique utilisant une puce dédiée à l'EGA et b) l'analyse du profil d'expression de gènes candidats par qRT-PCR dans les embryons fécondés et clonés.

Dans un premier temps nous avons optimisé le protocole d'amplification d'ARNm pour l'analyse du transcriptome de matériels rares. Puis nous avons fait l'analyse du transcriptome avant et après EGA d'embryons issus d'ovocytes prélevés sur des vaches phénotypées comme « bonnes » ou « mauvaises » donneuses d'embryons. En outre, ces ovocytes ont été maturés soit in vivo soit in vitro. Nos analyses montrent que l'effet individuel est plus important que l'effet « bonne ou mauvaise donneuse » ou même que l'effet « conditions de maturation ». Nous avons ensuite analysé les expressions géniques de 5 types d'embryons clonés ayant différents potentiels de développement à terme en fonction de la lignée cellulaire utilisée comme source de cellules donneuses. Globalement, leur expression génique est proche de celle de morulae FIV, mais quelques gènes présentent une expression différente. Ces gènes varient avec la lignée de cellules donneuses et leur nombre n'est pas lié à l'aptitude au développement à terme. L'analyse d'un lien éventuel entre leur nature et cette aptitude devra être poursuivie.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les profils d'expression spatio-temporelle des transcrits et des protéines des gènes de pluripotence (*OCT4*, *SOX2* et *NANOG*) et les niveaux d'ARNm de certains de leurs cibles dans les ovocytes et les embryons précoces

chez le bovin. Les profils d'expression de ces gènes ont aussi été analysés dans des embryons clonés présentant différents potentiels de développement à terme. Nos résultats montrent que (1) la triade de gènes de pluripotence n'est probablement pas impliquée dans l'EGA bovine. (2) les transcrits et protéines de *SOX2* et de *NANOG* sont restreints au lignage pluripotent plus tôt que ceux de *OCT4*, (3) les embryons à faible taux de développement à terme ont un taux de transcription plus élevé, néanmoins, l'équilibre précaire entre les gènes de pluripotence est maintenue. Cet équilibre pourrait permettre un développement normal in vitro, mais le taux de transcription plus élevé pourrait avoir des conséquences délétères sur le développement ultérieur.

In natural fertilization, sperm and ovum unite to form a totipotent zygote. Initially, the zygote is transcriptionally inactive and after few cleavages (8-16-cell stage in bovine) embryonic genome activation (EGA) takes place and embryo shifts from maternal to embryonic control, the process called maternal to embryonic transition (MET). Likewise, in nuclear transplantation (cloning) a somatic cell nucleus achieves totipotency when placed in an enucleated oocyte, the process called "nuclear reprogramming". In fact, nuclear reprogramming in cloning experiments is equivalent to MET; however, this process is afflicted with low efficiency. The objectives of this study in bovine were a) to explore the process of **MET reprogramming** of in vitro fertilized (IVF) embryos and b) to estimate the efficiency of **gene reprogramming after nuclear transfer** in animal cloning. We hypothesized that the acquisition of a proper gene expression pattern could herald development potential of the embryos, which could be assessed as early as morula stage or after embryonic genome activation (EGA) in bovine. Here, we opted for a study plan consisting of two axes a) global gene expression analysis using an EGA-dedicated microarray and b) candidate gene expression profiling through qRT-PCR in the fertilized and cloned bovine embryos.

Firstly, we optimized the protocol of mRNA amplification for transcriptome analysis which generates antisense-RNA (aRNA). Then we did transcriptomic analysis of the 4-cell and morulae derived from two genotypes having better and two genotypes having poorer in vitro embryonic development potentials. In addition, these oocytes were either matured in vivo or in vitro. We observed that the effect of individual genotype was more important than the effect of the phenotypic category (poorer or better) or conditions of oocyte maturation. Furthermore, we explored the expression patterns of 5 types of cloned embryos having different full term developmental potentials depending upon the donor cell line used. Their genes expression patterns closely resembled to the IVF morulae, except for few genes which present differences. These genes vary with the cell line used as somatic cell donor for SCNT and the number of these deregulated genes did not increase with the poorer developmental potential of the cloned embryos. The analysis of an eventual correlation between the potential for embryonic development to term and nature of the deregulated genes should be addressed.

Secondly, we charted quantitative and/or qualitative spatio-temporal expression patterns of transcripts and proteins of pluripotency genes (*OCT4*, *SOX2* and *NANOG*) and mRNA levels of some of their downstream targets in bovine oocytes and early embryos. Furthermore, to correlate expression patterns of these genes with term developmental

potential, we used cloned embryos, instead of gene ablation, having similar in vitro but different full term development rates. We chose these genes to be analysed since pluripotency genes are implicated in mouse embryonic genome activation (EGA) and pluripotent lineage specification. Moreover, their expression levels have been correlated with embryonic term development. Our findings affirm: *first*, the core triad of pluripotency genes probably is not implicated in bovine EGA since their proteins were not detected during pre-EGA phase, despite the transcripts for *OCT4* and *SOX2* were present. *Second*, an earlier ICM specification of *SOX2* and *NANOG* makes them better candidates of bovine pluripotent lineage specification than *OCT4*. *Third*, embryos with low term development potential have higher transcription rates; nevertheless, precarious balance between pluripotency genes is maintained. This balance presages normal in vitro development but, probably higher transcription rate disturbs it at later stage that abrogates term development.