



HAL
open science

Le dimorphisme sexuel chez l'embryon de bovin

Ewa Pilath

► **To cite this version:**

Ewa Pilath. Le dimorphisme sexuel chez l'embryon de bovin. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04609675

HAL Id: dumas-04609675

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04609675v1>

Submitted on 12 Jun 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2024

LE DIMORPHISME SEXUEL CHEZ L'EMBRYON BOVIN

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 13 mars 2024

par

Ewa, Camille, Suzanne PILATH

sous la direction de

Alline DE PAULA REIS

JURY

Président du jury :	M. Alain FONTBONNE	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Alline DE PAULA REIS	Maître de Conférences à l'EnvA
Examineur :	M. Laurent TIRET	Professeur à l'EnvA
Membre invité :	Mme Véronique DURANTHON	Directrice de Recherches INRAE Unité de Biologie de la Reproduction Environnement Épigénétique et Développement (BREED)

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version Janvier 2024

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
Mme	Chastant	Sylvie	Professeur	DPASP
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valérie	Professeur	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquibet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guénec	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Professeur	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

À M. Alain Fontbonne, Président du Jury de cette thèse, Professeur à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse, hommages respectueux.

À Mme Aline De Paula Reis, Maître de conférences à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur de me proposer ce sujet, pour m'avoir guidée et encadrée tout au long de la réalisation de cette thèse, pour votre disponibilité et vos précieux conseils, très sincères remerciements.

À M. Laurent Tiret, Professeur à l'EnvA,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse, sincères remerciements.

À Mme Véronique Duranthon, Directrice de recherche INRAE unité de biologie de la reproduction environnement épigénétique et développement (BREED)

Pour votre bienveillance, votre gentillesse et votre aide précieuse, pour le temps que vous avez consacré à cette thèse, très sincères remerciements.

À ma famille, à mes amis,

Pour votre amour et votre soutien, merci infiniment.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	9
Première partie : Le développement embryonnaire de l'espèce bovine et les différents axes d'intérêt pour l'analyse du dimorphisme sexuel.....	11
1. Généralités sur le développement préimplantatoire de l'embryon bovin <i>in vivo</i>	11
A. Les changements morphocinétiques : de la fécondation au stade blastocyste.....	11
B. Écllosion et élongation.....	12
C. L'implantation.....	13
D. Résumé des étapes du développement préimplantatoire <i>in vivo</i> de l'embryon de bovin, de la fécondation à l'implantation.....	14
E. Expression génique de l'embryon bovin et influence épigénétique.....	15
2. La production d'embryon <i>in vitro</i>	17
Deuxième partie : Qu'est-ce que le dimorphisme sexuel ?.....	21
1. Définition du dimorphisme sexuel.....	21
2. Déterminisme du sexe.....	21
A. Définition d'un embryon mâle et d'un embryon femelle.....	21
B. Inactivation du chromosome X.....	21
3. Les différentes techniques de sexage.....	22
A. Technique de sexage au microscope.....	22
B. Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin.....	22
C. Méthode LAMP.....	23
D. Amplification par PCR d'une partie du gène de l'amélogénine.....	24
E. Comparaison des différentes techniques de sexage.....	25
Troisième partie : Le dimorphisme sexuel de l'embryon bovin au cours du développement embryonnaire.....	27
1. Dimorphisme sexuel et morphocinétique du développement embryonnaire.....	27
a. Existe-t-il des différences morphocinétiques entre les embryons mâles et femelles ?.....	27
b. Comment expliquer une telle différence ?.....	28
c. Existe-t-il un impact du choix du taureau sur le sex-ratio ?.....	29
d. Peut-on utiliser les différences morphocinétiques pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ?.....	29
2. Dimorphisme sexuel au cours de l'élongation et de l'implantation.....	31
A. Les mécanismes de l'élongation et de l'implantation.....	31
a. L'élongation.....	31
b. L'implantation.....	31
B. Dimorphisme sexuel et interféron tau.....	32
a. Existe-t-il une différence de production d'IFN τ entre les embryons mâles et femelles ?.....	32
b. Comment expliquer une telle différence ?.....	32
c. Le milieu de culture a-t-il une influence sur le dimorphisme lié à l'IFN τ ?.....	33
d. Peut-on utiliser ces différences pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ?.....	33
3. Dimorphisme sexuel et métabolisme de l'embryon.....	34
A. Le métabolisme embryonnaire : de la fécondation au stade blastocyste.....	34
B. Dimorphisme sexuel et métabolites présents dans l'utérus.....	38
a. Existe-t-il une différence de métabolites entre les liquides utérins contenant un embryon mâle et femelle ?.....	38
b. Comment expliquer une telle différence ?.....	38

<i>C. Dimorphisme sexuel et glucides</i>	39
a. Existe-t-il une différence entre le métabolisme du glucose des embryons mâles et celui des femelles ? ...	39
b. Comment expliquer une telle différence ?	39
c. Quel est l'impact du dimorphisme sexuel sur le sex-ratio ?	40
d. Peut-on utiliser ces différences pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ? ..	41
<i>D. Dimorphisme sexuel et acides aminés</i>	44
a. Existe-t-il une différence dans le métabolisme des acides aminés des embryons mâles et celui des femelles ?	46
b. Comment expliquer une telle différence ?	47
c. Peut-on utiliser ces différences pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ? ..	48
<i>E. Dimorphisme sexuel et oxygène</i>	50
Discussion	51
Conclusion	55
Liste des références bibliographiques	57
Annexe 1	65
Annexe 2	66
Annexe 3	67
Annexe 4	69
Annexe 5	70
Annexe 6	71
Annexe 7	74
Annexe 8	75

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes du développement préimplantatoire de l'embryon bovin (Stringfellow et Givens, 2010).....	12
Figure 2 : Coupe transversale d'utérus avec l'embryon implanté (McGeady <i>et al.</i> , 2013).....	13
Figure 3 : Évolution morpho-cinétique de l'embryon de bovin au cours de la phase préimplantatoire (Ledoux, 2011).	14
Figure 4 : Expression génique et reprogrammation épigénétique au cours du développement embryonnaire (Duranthon, 2019).....	16
Figure 5 : Les différents systèmes de culture embryonnaire <i>in vitro</i> (Ferré <i>et al.</i> , 2020).....	18
Figure 6 : (a) Caryotype et € cellule en métaphase d'un bovin mâle (Popescu, 1971).....	22
Figure 7 : Électrophorèse sur gel d'agarose d'échantillons bovins amplifiés par PCR (Peura <i>et al.</i> , 1991).....	23
Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme et des différentes étapes de la réaction LAMP (Notomi <i>et al.</i> , 2000).....	24
Figure 9 : Résultat de l'analyse par PCR des gènes de l'amélogénine sur les chromosomes X et Y (Jeulin, 2022).....	25
Figure 10 : Diagramme de dispersion montrant la quantité d'IFN τ (en pg par embryon) produites par les blastocystes mâles et femelles collectés <i>in vivo</i> au jour 9 post-insémination après 24 et 48 heures de culture (Kimura <i>et al.</i> , 2004 a).....	33
Figure 11 : Les différentes voies de production d'énergie au cours du développement de l'embryon (Milazzotto <i>et al.</i> , 2020).....	34
Figure 12 : Voie des pentoses phosphates et glycolyse (Stinccone <i>et al.</i> , 2015).....	35
Figure 13 : Voie de O-GlcNAcylation des protéines (Issad et Pagesy, 2014).....	36
Figure 14 : Rôle des lipides lors du développement embryonnaire (Ribeiro <i>et al.</i> , 2016).....	37
Figure 15 : Identification de HK-I, PFK-1, PKM1/2, GAPDH et de GLUT-1 dans les blastocystes bovins par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate (Garcia-Herreros <i>et al.</i> , 2012)	40
Figure 16 : Fiabilité de la variable pyruvate pour prédire le sexe de l'embryon (Rubessa <i>et al.</i> , 2018)	42
Figure 17 : Catabolisme du squelette carboné des acides aminés (cours pdf)	44
Figure 18 : Voies de biosynthèse des acides aminés (cours pdf).....	45
Figure 19 : Classification de la variable de prédiction valine (Rubessa <i>et al.</i> , 2018).....	48

Figure 20 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant le dimorphisme sexuel des embryons de bovins au cours des premiers jours de développement *in vitro* 51

Figure 21 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant le dimorphisme sexuel des embryons de bovins au stade jeune blastocyste 52

Figure 22 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant le dimorphisme sexuel des embryons de bovins et les acides aminés au cours des premiers jours de développement *in vitro*53

Figure 23 : Schéma récapitulatif des indicateurs candidats au diagnostic *in vitro* du sexe de l'embryon..... 54

Liste des tableaux

Tableau 1 : Élongation de l'embryon de bovin. D'après (Degrelle <i>et al.</i> , 2005)	13
Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différents systèmes de culture embryonnaire <i>in vitro</i> . D'après (Biggers et Summers, 2008)	18
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de sexage	25

Liste des abréviations

ADP = Adénosine diphosphate

ATP = Adénoside triphosphate

BADGP = Benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside

BOEC = Cellules épithéliales de l'oviducte de bovin

BSA = Albumine de sérum bovin

COC = Complexe cumulo-ovocytaire

CpG = Cytosine phosphate guanine

DHEA = Déhydroépiandrostérone

DNMT3B = ADN (cytosine-5-)-méthyltransférase 3 bêta

EGA = Activation du génome embryonnaire

FSB = Sérum de veau fœtal

GAPDH = Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GSK-3 = Glucogen synthase kinase-3

G6PD = Glucose-6-phosphate déshydrogénase

HK-I = Hexokinase-I

HPLC = Chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression

HPRT = Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

IFN τ = Interféron tau

LAMP = Amplification isotherme médiée par boucle

LOS = Large offspring syndrome

MAT = Malate aspartate

MET = Transition materno-embryonnaire

OGT = Enzyme O-linked GlcNAc Transferase

OXTR = Transcription du gène récepteur de l'ocytocine

PC = Pyruvate carboxylase

PCC = Propionyl-CoA

PCR = Réaction en chaîne par polymérase

PFK = Phosphofructokinase

PGK = Phosphoglycérate kinase

PKM $\frac{1}{2}$ = Pyruvate kinase $\frac{1}{2}$

PPP = Pentoses phosphates

P₄ = Progestérone

RMN 1H = Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution

ROS = Espèces réactives de l'oxygène

SECM = Microscopie électrochimique à balayage

SOF = Fluide d'oviducte synthétique

TCA = Acide tricarboxylique

UDP-GlcNAc = Uridine 5-diphospho N-acétylglucosamine

Xist = X-inactive specific transcript

5meC = 5-méthylcytosine

6-AN = 6-amino-nicotinamide

Introduction

La production d'embryon *in vitro* et le transfert embryonnaire évoluent et leur nombre augmente depuis plusieurs années, comme le montre le 31^e rapport annuel de l'International Embryo Technology Society (IETS) publié en 2022, recueillant des données à l'échelle mondiale au cours de l'année 2021. Le nombre total d'embryons de bovins produits *in vitro* s'élevait à 1 521 018 et celui des embryons de bovin collectés *in vivo* s'élevait à 386 374. Parmi les données recueillies sur quatre espèces (bovins, ovins, caprins et équins), l'augmentation la plus remarquable a été enregistrée chez l'espèce bovine : une augmentation de 31,5 % par rapport à 2020 (1 521 018 contre 1 156 422, respectivement) (Viana, 2022).

Cette croissance de la production *in vitro* d'embryons de bovins pousse les chercheurs à approfondir la compréhension du comportement métabolique au cours du développement embryonnaire, notamment les différences liées au sexe, afin d'essayer d'améliorer cette voie de production d'embryons.

Le projet BoSex-Dim réalisée par l'équipe du Docteur Duranthon (UMR BREED) s'intéresse à ce sujet. Plus précisément, un de leurs objectifs, est d'identifier de manière précoce le dimorphisme sexuel de l'embryon bovin et de connaître en détail les caractéristiques de celui-ci, au cours de trois étapes précises du développement. Cette étude est d'autant plus pertinente que les bovins mâles et les femelles sont utilisés différemment dans les exploitations laitières et allaitantes (BoSex-Dim, 2017).

Les étapes du développement embryonnaire citées précédemment sont :

- 7 jours post-fécondation : cela correspond à la dernière étape du développement pour laquelle on peut agir *in vitro*. Chez l'embryon femelle, on se situe avant l'inactivation du chromosome X.
- 18 jours post-fécondation : l'élongation de l'embryon bovin est terminée et l'implantation dans l'utérus de la mère peut commencer. C'est le dernier stade où l'on peut récupérer des embryons de manière peu invasive par la voie transcervicale.
- 40 jours post-fécondation : l'organogenèse est déjà bien avancée, les gonades ne sont pas encore différenciées en testicules ou en ovaires et l'imprégnation hormonale n'a pas encore commencée.

Cette thèse consiste en une revue de littérature qui va s'intéresser au dimorphisme sexuel en matière de morphocinétique et le métabolisme lors du développement préimplantatoire de l'embryon de bovin.

Première partie : Le développement embryonnaire de l'espèce bovine et les différents axes d'intérêt pour l'analyse du dimorphisme sexuel

1. Généralités sur le développement préimplantatoire de l'embryon bovin *in vivo*

La période préimplantatoire de l'embryon de bovin s'étend de la fécondation à l'implantation de ce dernier à la paroi de l'utérus. Elle a une durée très variable selon les espèces de mammifères, chez les bovins elle dure environ 20 jours. Durant cette période, l'embryon n'est pas lié à l'utérus, il possède donc une certaine autonomie.

A. Les changements morphocinétiques : de la fécondation au stade blastocyste

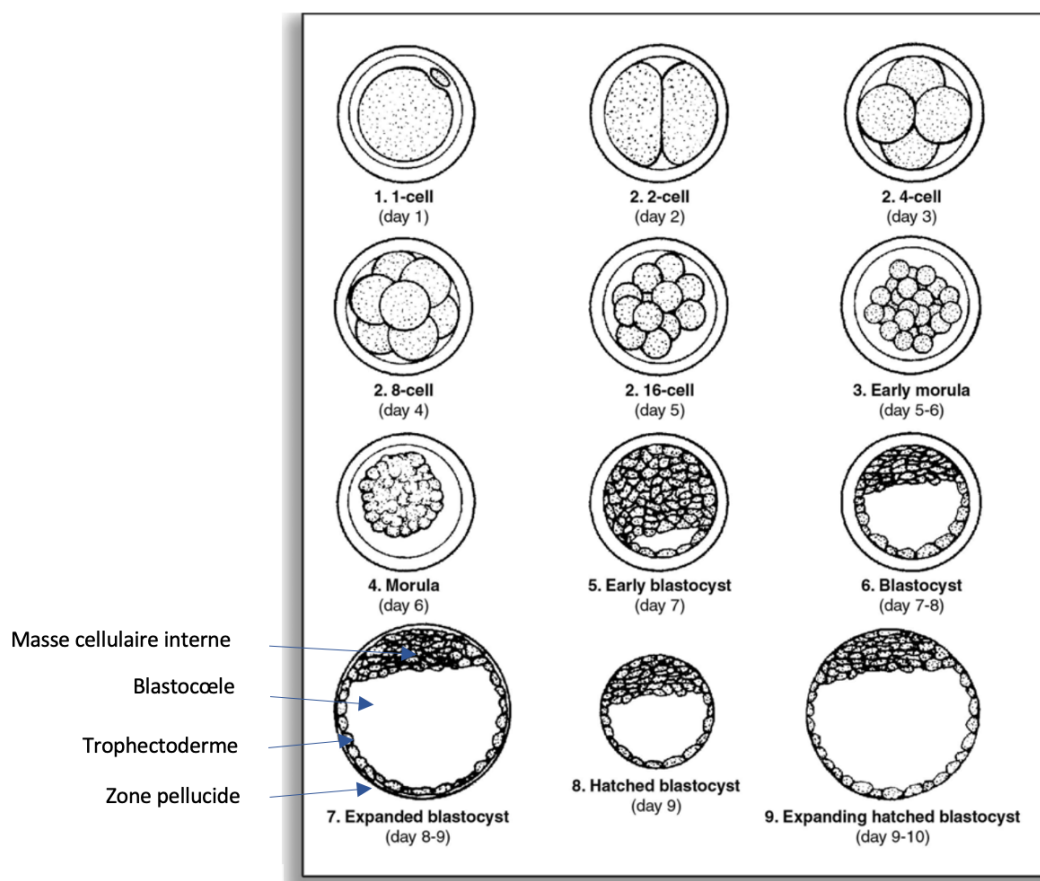
Lors de la fécondation, qui a lieu dans l'ampoule de l'oviducte (Ledoux, 2011), le spermatozoïde et l'ovocyte entrent en contact et leurs membranes fusionnent. Cela conduit à la formation d'un embryon au stade une cellule, le zygote. À la fin de ce stade, les génomes haploïdes du spermatozoïde et de l'ovocyte vont fusionner, c'est la syngamie (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014). L'ovocyte qui était préalablement bloqué en métaphase II, reprend sa division cellulaire et devient alors une cellule haploïde suite à l'expulsion du 2ème globule polaire. On observe alors un appariement des chromosomes paternels et maternels (Ledoux, 2011).

Par la suite, les premières divisions embryonnaires vont avoir lieu. Ce sont des divisions de clivage, qui se réalisent à volume constant, c'est-à-dire que le volume initial du zygote est conservé tout au long du processus. Cela conduit à la formation de cellules totipotentes appelées blastomères (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014). La formation des deux premiers blastomères se produit dans les 24 heures environ après la fécondation (Hanzen, 2015).

Suite aux divisions de clivage qui se succèdent, se produit le phénomène de compaction qui conduit à la formation d'un blastocyste. De nombreux processus rentrent en jeu, un changement de forme des blastomères, la présence d'un gradient ionique différent entre les cellules internes et externes de la morula, grâce à des pompe à sodium-potassium, qui induit, par osmose, une accumulation de liquide et permet ainsi la croissance du blastocœle, la mise en place de jonctions d'adhérences et l'initiation des premières différenciations cellulaires (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014 ; Hanzen, 2015 ; Rodriguez-Alonso *et al.*, 2020).

Ces divisions asynchrones aboutissent à la formation de deux populations cellulaires qui composent les différentes structures du blastocyste (Hanzen, 2015). La plus externe, le trophoctoderme, correspond à l'épithélium externe (qui formera par la suite le placenta). À l'intérieur, on retrouve une cavité liquidienne, le blastocœle et un ensemble de petites cellules non différenciées appelé la masse cellulaire interne. Cette dernière sera à l'origine des tissus embryonnaires et d'une partie des annexes extra-embryonnaires (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

Figure 1 : Les étapes du développement préimplantatoire de l'embryon bovin (Stringfellow et Givens, 2010)



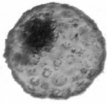



B. Éclosion et élongation

Aux alentours du 9ème - 10ème jour, le trophoctoderme produit des enzymes protéolytiques qui fragilisent la zone pellucide. Du fait de la pression osmotique le blastocyste se remplit de liquide et s'étend progressivement alors que le trophoctoderme s'amincit, ce qui conduira à une augmentation de 60 % de son diamètre, on parle de blastocyste expansé. Ces mécanismes entraînent la rupture de la zone pellucide, c'est l'éclosion (Rodríguez-Alonso *et al.*, 2020 ; Negrón-Pérez et Hansen, 2017). Ce processus dure en moyenne 12 heures (Hazen, 2015). Chez les bovins, c'est un activateur du plasminogène de type urokinase qui est responsable de la dégradation enzymatique de la zone pellucide (Negrón-Pérez et Hansen, 2017).

Une fois libéré, le blastocyste s'étend rapidement et change de forme, c'est l'élongation. Sa taille va alors être multipliée par 1000. Il passe d'abord par un stade ovoïde, puis tubulaire et enfin filamenteux (Degrelle *et al.*, 2005). Il est alors appelé conceptus (Brooks *et al.*, 2014).

Lors de l'allongement du conceptus, on observe une augmentation de la longueur et du poids du trophoctoderme ainsi que le début de la différenciation des membranes extra-embryonnaires (Brooks *et al.*, 2014).

Tableau 1 : Élongation de l'embryon de bovin. D'après (Degrelle *et al.*, 2005)

Jour	Stade	Taille	Aspect
J7	Blastocyste	150µm	
J10	Écllosion	/	/
J12	Stade ovoïde	1 – 2 cm de longueur	
J15	Stade tubulaire	5 – 6 cm de longueur	
J17	Stade filamenteux	13 – 15 cm de longueur	
J18	L'embryon filamenteux occupe toute la cavité utérine	Jusqu'à 40 cm de longueur	

C. L'implantation

L'implantation est l'étape suivant l'élongation. C'est le premier contact entre l'embryon et la paroi de l'utérus. Elle a lieu aux alentours du 19ème - 20ème jour chez les bovins (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

Chez les bovins, on parle d'implantation centrée ou superficielle (Figure 3). Les sacs remplis de liquide qui entourent l'embryon se dilatent afin que les membranes extra-embryonnaires s'accrochent à l'épithélium utérin et s'y fixent (McGeady *et al.*, 2013).

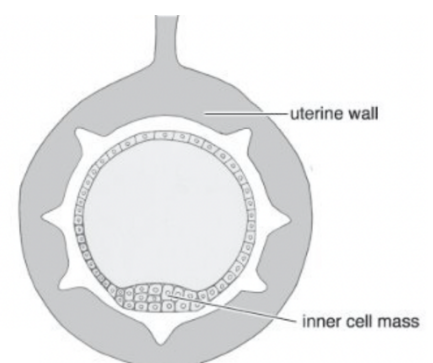
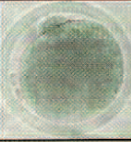

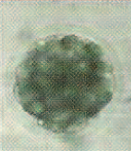





Figure 2 : Coupe transversale d'utérus avec l'embryon implanté (McGeady *et al.*, 2013)

D. Résumé des étapes du développement préimplantatoire *in vivo* de l'embryon de bovin, de la fécondation à l'implantation

De la fécondation à l'implantation, l'embryon se développe progressivement. La fécondation a lieu dans l'ampoule de l'oviducte. Puis 24 – 48 heures après, l'embryon qui est maintenant au stade 8 cellules, se retrouve à la jonction utéro-tubulaire. Cinq à six jours après la fécondation, l'embryon au stade 16 – 32 cellules arrive à l'entrée de l'utérus. Le phénomène de compaction au stade 64 cellules a lieu un jour après. On observe alors l'apparition d'un blastocyste avec une cavité blastocoelique. Le blastocyste se développe jusqu'à l'éclosion qui a lieu 9 – 10 jours après la fécondation. On observe alors une croissance rapide de ce dernier, qui s'allonge, c'est l'élongation. L'implantation a lieu aux alentours du 19^{ème} – 20^{ème} jours (Ledoux, 2011).

Figure 3 : Évolution morpho-cinétique de l'embryon de bovin au cours de la phase préimplantatoire (Ledoux, 2011).

Jour *	Etape	Lieu	Description	
1	Fécondation	O V I D	La fécondation marque le début de la période embryonnaire. C'est l'ensemble des transformations qui se produisent dans l'œuf, suite à l'interaction et à la fusion des gamètes.	
2 - 4	Segmentation	U C T E	La première étape du développement de l'œuf fécondé ou zygote est appelée segmentation et correspond à des divisions répétées, qui aboutissent à la formation de cellules semblables de plus en plus petites ou blastomères.	
5	Morula (150 µm)	U T E R U S	L'étape de compaction, c'est-à-dire liaison intime entre les cellules, survient au stade morula (32-64 cellules), environ 5 jours après les chaleurs. Pendant la compaction, la morphologie des blastomères évolue de façon différenciée pour aboutir à la formation du blastocyste.	
7-8	Blastocyste (150-350 µm)		Le blastocyste est défini par la présence d'une cavité centrale, le blastocœle, entouré par une couche de cellules, appelée trophoblaste (futur placenta) et par un petit groupe de cellules formant le bouton embryonnaire (futur veau). Il est entouré de la zone pellucide, qui joue le rôle de barrière protectrice.	
9-10	Eclosion (400 µm -> 2 cm)		L'éclosion correspond à la perte de la zone pellucide par le blastocyste. Celle-ci s'amincit puis se rompt suite à l'expansion du blastocœle de l'embryon.	
11	Elongation		A partir du 11 ^{ème} jour, le blastocyste perd sa forme sphérique et s'allonge très rapidement : c'est l'élongation. Pendant cette période, il envahit progressivement la cavité utérine, qu'il occupe en totalité vers le 18 ^{ème} jour. Il atteint alors 40 cm.	

* par rapport aux chaleurs

(Source : images 1 à 5, UNCEIA et image 6, INRA)

E. Expression génique de l'embryon bovin et influence épigénétique

Après la fécondation, on constate une reprogrammation des génomes maternel et paternel. Elle se caractérise par une série de modifications épigénétiques, indispensable au développement embryonnaire (Ross et Sampaio, 2018).

Au début du développement, le génome de l'embryon est transcriptionnellement inactif. Le développement embryonnaire dépend uniquement de l'ARN et des protéines stockées dans l'ovocyte (Beaujean *et al.*, 2020). Cette information maternelle, régulée au cours du développement par des modifications post-transcriptionnelles, code pour des facteurs impliqués dans les fonctions indispensables aux premières étapes du développement. La régulation de cette information va permettre de moduler la stabilité et la traductibilité des transcrits ainsi que la fonction et la localisation des protéines (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

Les facteurs maternels jouent un rôle fondamental et sont impliqués dans la transcription, les modifications épigénétiques, le remodelage de la chromatine et sa propre dégradation (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014). Au stade 8 cellules, ces modifications épigénétiques permettent l'activation du génome embryonnaire (EGA), indispensable pour la suite du développement et notamment pour assurer la première différenciation cellulaire au stade blastocyste (Beaujean *et al.*, 2020). On observe la dégradation progressive des ARNm et protéines maternels, la synthèse des premiers transcrits et une reprogrammation de l'expression des gènes, c'est la transition materno-embryonnaire (MET) (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014 ; Memili et First, 2000).

Au cours du développement embryonnaire, les différenciations cellulaires se succèdent afin que les cellules initialement pluripotentes puissent se spécialiser. Pour cela, différents mécanismes entrent en jeu. Des facteurs de transcription permettent d'activer des programmes génétiques spécifiques de chaque lignage et des mécanismes épigénétiques permettent l'activation ou la répression de l'expression génique. Parmi ces mécanismes épigénétiques, on retrouve des modifications post-traductionnelles des histones (acétylation/désacétylation et phosphorylation) et la méthylation de l'ADN (Guibert *et al.*, 2009).

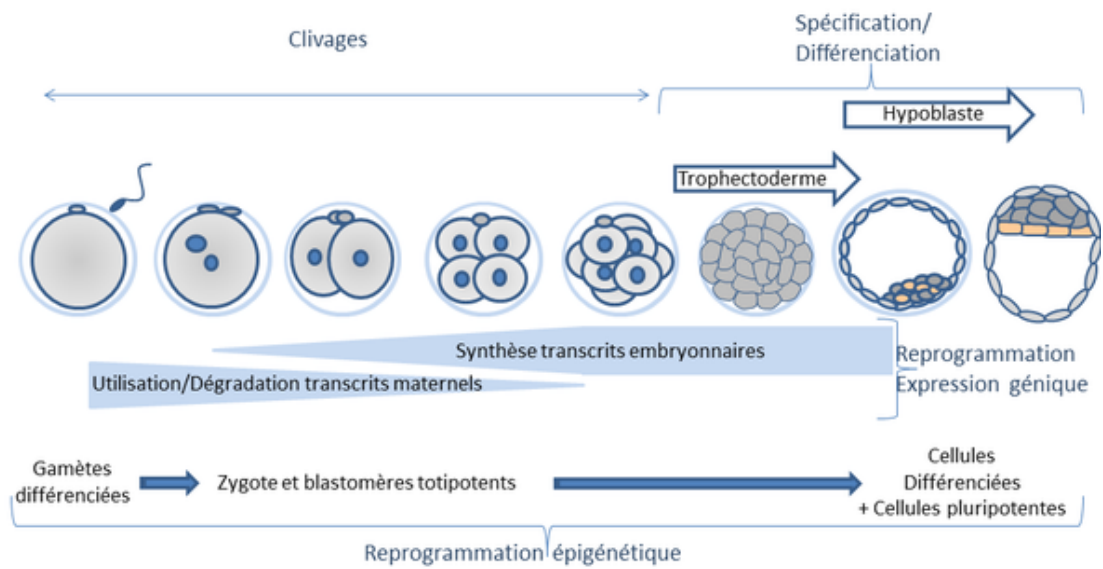
L'architecture chromosomique est l'un des facteurs les plus importants du contrôle de l'expression des gènes. Les chromosomes et la chromatine subissent des modifications majeures au cours du développement embryonnaire. La façon dont la chromatine est remodelée au début du développement est importante pour comprendre les effets épigénétiques durables qui n'apparaîtront qu'à l'âge adulte (Memili et First, 2000).

La modification des histones joue un rôle clé dans la détermination du modèle d'activité et dans la répression des gènes. L'acétylation entraîne un relâchement de la structure de la chromatine, ce qui permet aux facteurs d'initiation de la transcription de se lier à l'ADN. La désacétylation des histones entraîne une inhibition de la transcription (Memili et First, 2000).

La méthylation de l'ADN s'effectue sur le carbone 5 des cytosines des dinucléotides CpG (« cytosine-phosphate-guanine ») qui deviennent alors des 5-méthylcytosine (5meC). La présence de ces cytosines méthylées, associées à des régulateurs ou des promoteurs, inhibent l'expression des gènes (Guibert *et al.*, 2009 ; Beaujean *et al.*, 2020). Au niveau intragénique, elle aurait, au contraire, un rôle activateur en limitant des démarrages de transcription illégitimes (Schübeler, 2015).

On constate une diminution de 5meC tout au long du développement préimplantatoire, associée à une vague successive de méthylation et déméthylation de novo qui coïncide avec les grandes étapes du développement. Une des principales enzymes responsables de la variation du niveau de 5meC est l'ADN (cytosine-5-)-méthyltransférase 3 bêta (DNMT3B) (Beaujean *et al.*, 2020).

Figure 4 : Expression génique et reprogrammation épigénétique au cours du développement embryonnaire (Duranthon, 2019)



Comme nous l'avons vu précédemment, l'embryon est sensible à l'environnement dans lequel il se développe. La production *in vitro* a donc un impact sur l'expression génique et le profil épigénétique des embryons. On observe des anomalies conduisant à une augmentation du taux d'apoptose et une diminution du taux de blastocystes. Les conditions de culture et la cryoconservation entraînent par exemple des modifications d'histones, du nombre de transcrits et du niveau de 5meC (Lonergan *et al.*, 2006 ; Stinshoff *et al.*, 2011).

2. La production d'embryon *in vitro*

La production *in vitro* commence par la maturation *in vitro* des ovocytes et la fécondation *in vitro*. Une fois fécondé, le zygote est alors placé dans un milieu de culture dans lequel le développement embryonnaire va pouvoir avoir lieu pendant 7 jours, jusqu'au stade blastocyste (Ferré *et al.*, 2020).

La première technique mise en place pour le développement embryonnaire *in vitro* a été la coculture. Les embryons étaient cultivés sur tapis cellulaire comme les cellules épithéliales de l'oviducte de bovin (BOEC) (Ferré *et al.*, 2020).

Actuellement, le développement embryonnaire *in vitro* se déroule dans des milieux synthétiques qui tentent de répondre aux besoins de l'embryon. En effet, le liquide présent dans l'oviducte est complexe et contient de nombreux éléments nécessaires au bon développement *in vivo* de l'embryon. On retrouve notamment des protéines telles que des facteurs de croissance, des piègeurs de radicaux libres et des enzymes (Lamy *et al.*, 2018).

Dans les premiers milieux de culture, du sérum animal était ajouté comme du sérum de veau fœtal (FSB) ou de l'albumine de sérum bovin (BSA) (Ferré *et al.*, 2020). Mais cette technique présentait de nombreux inconvénients. Elle altérait la cryotolérance de l'embryon (Rizos *et al.*, 2003) et induisait un syndrome, le « large offspring syndrome » (LOS) (Lazzari *et al.*, 2002) qui se caractérise, entre autres, par un trouble de la croissance chez les ruminants avec un poids excessif à la naissance, une macroglossie, une hernie ombilicale, une hypoglycémie et une viscéromégalie (Chen *et al.*, 2013).

De manière générale, les laboratoires commerciaux et de recherche préparent leurs propres milieux de culture qui se composent généralement, pour les bovins, d'une solution saline équilibrée, de bicarbonate de sodium, d'acides aminés essentiels et non essentiels, de L-glutamine, de phosphatase, de pyruvate, d'antibiotiques, de vitamines, d'EDTA, de sucre, d'éléments nutritifs ainsi que d'autres facteurs de protection comme des antioxydants (Gardner, 2008).

Intéressons-nous maintenant aux systèmes de culture. Il en existe deux, le système de monoculture et le système de culture en milieu séquentiel.

Dans le système de monoculture, un seul milieu est utilisé durant toute la période de culture de l'embryon. Le milieu le plus utilisé chez les bovins est le fluide d'oviducte synthétique (SOF) mais il en existe d'autres, par exemple, CR1, KSOM (milieu d'optimisation simplex de potassium) ou encore IVD101 (milieu, sans sérum, améliorés). Ce système peut se décliner en deux versions. Dans la première, le milieu n'est pas renouvelé, il reste totalement inchangé tout au long du processus. Pour la deuxième, un renouvellement du milieu est effectué toutes les 48 heures pour éviter l'accumulation de substances toxiques (Ferré *et al.*, 2020).

Dans le système de culture en milieu séquentiel, plusieurs milieux sont utilisés lors du développement *in vitro*. Ce système se base sur le fait que le métabolisme embryonnaire évolue au cours du temps, notamment concernant la capacité à métaboliser le glucose. Mais aussi sur le fait que l'environnement de l'embryon évolue au cours du temps. Ainsi, ce système permettrait une meilleure adaptation du milieu aux besoins de l'embryon (Ferré *et al.*, 2020).

Figure 5 : Les différents systèmes de culture embryonnaire *in vitro* (Ferré et al., 2020)

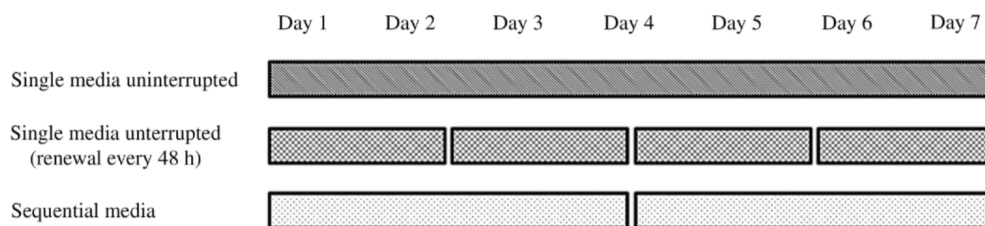


Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différents systèmes de culture embryonnaire *in vitro*. D'après (Biggers et Summers, 2008)

	Avantages	Inconvénients
Monoculture sans renouvellement	<ul style="list-style-type: none"> - Minimiser les manipulations de l'embryon - Accumulation de facteurs endogènes bénéfiques - Stress environnemental minimal - Nécessite un contrôle qualité sur un seul milieu - Difficulté faible - Coût faible 	<ul style="list-style-type: none"> - Non adaptation aux besoins de l'embryon en nutriments - Accumulation de toxines
Monoculture avec renouvellement	<ul style="list-style-type: none"> - Adaptation aux besoins de l'embryon en nutriments - Élimination des toxines - Nécessite un contrôle qualité sur un seul milieu - Coût faible 	<ul style="list-style-type: none"> - Perturbation de l'embryon - Perte des facteurs endogènes bénéfiques - Stress environnemental modéré - Difficulté modérée
Milieu séquentiel	<ul style="list-style-type: none"> - Adaptation aux besoins de l'embryon en nutriments - Élimination des toxines 	<ul style="list-style-type: none"> - Perturbation de l'embryon - Perte des facteurs endogènes bénéfiques - Stress environnemental élevé - Nécessite un contrôle qualité sur tous les milieux différents utilisés - Difficulté élevée - Coût élevé

Au bout des 7 jours de développement *in vitro*, le blastocyste peut soit être directement transféré dans une femelle receveuse, soit être cryoconservé. Seuls les embryons de bonne qualité seront congelés pour assurer une viabilité post-décongélation (Ferré *et al.*, 2020).

Il faut savoir que seulement 20 à 40% des embryons cultivés *in vitro* atteignent le stade blastocyste (Rizos *et al.*, 2008), cela peut être dû à des conditions de culture inadaptées ou encore à une maturation cytoplasmique incomplète des ovocytes (Sirard *et al.*, 2006). En effet, aux stades quatre cellules et morula, les embryons *in vitro* sont particulièrement sensibles aux conditions de culture (Gad *et al.*, 2012). Ces différences d'environnement *in vitro* et *in vivo* expliquent que l'on retrouve des différences de métabolisme, d'expression génique, de performance et de cryotolérance entre les embryons *in vitro* et *in vivo* (Ferré *et al.*, 2020).

Deuxième partie : Qu'est-ce que le dimorphisme sexuel ?

1. Définition du dimorphisme sexuel

Le dimorphisme sexuel est défini dans le dictionnaire comme « l'ensemble des différences entre le mâle et la femelle d'une même espèce, en dehors de celles des organes sexuels eux-mêmes » (Larousse, s. d.).

Dans notre étude, nous allons nous intéresser plus particulièrement au dimorphisme sexuel au stade embryonnaire, c'est-à-dire à l'ensemble des différences entre les embryons mâles et femelles avant la formation des gonades.

Différents mots sont employés dans la littérature pour parler de dimorphisme sexuel. L'Annexe 1 en présente une liste exhaustive.

De plus, il faut faire la distinction entre dimorphisme sexuel et sex-ratio. Le sex-ratio est le rapport entre le nombre d'embryons de sexe masculin et ceux de sexe féminin (Le Robert, s. d.).

Ainsi certains articles utilisent la déviation du sex-ratio pour montrer l'existence de différences entre les embryons mâles et femelles et donc la mise en évidence d'un dimorphisme de réponse des embryons (Annexe 2).

2. Déterminisme du sexe

A. Définition d'un embryon mâle et d'un embryon femelle

C'est au moment de la fécondation que le sexe de l'embryon est établi, lorsque le spermatozoïde transmet soit un chromosome X, soit un chromosome Y à l'ovocyte. Il en résulte alors soit un embryon XX qui sera un embryon femelle, soit un embryon XY qui sera un embryon mâle (Hopper, 2021).

B. Inactivation du chromosome X

Les embryons femelles possèdent deux chromosomes X mais l'expression simultanée des gènes portés par ces chromosomes pourraient avoir des conséquences délétères pour l'embryon. Ainsi, on observe, au stade blastocyste, l'inactivation transcriptionnelle d'un des deux chromosomes X dans chaque cellule somatique. Le chromosome ainsi inactivé est appelé corps de Barr, il est choisi aléatoirement et peut être d'origine maternelle ou paternelle. L'inactivation débute au niveau d'une zone particulière appelée centre d'inactivation, puis se propage dans tout le chromosome (McGeady *et al.*, 2013). Elle commence au stade jeune blastocyste (De La Fuente *et al.*, 1999).

Ce processus fait intervenir la méthylation de l'ADN (Beaujean *et al.*, 2020) mais aussi un facteur de transcription appelé X-inactive specific transcript (Xist). Avant l'inactivation d'un des deux chromosomes X, Xist est exprimé à partir des deux allèles et s'accumule uniquement au niveau du site de transcription du chromosome à inactiver. Par la suite, on observe une propagation de l'ARNm de Xist sur toute la longueur du chromosome entraînant l'inactivation de ce dernier (Wrenzycki *et al.*, 2002).

Bien connaître la définition d'un embryon mâle et d'un embryon femelle est important pour appréhender le dimorphisme sexuel des embryons bovins, mais aussi pour permettre le sexage des embryons à travers différentes techniques.

3. Les différentes techniques de sexage

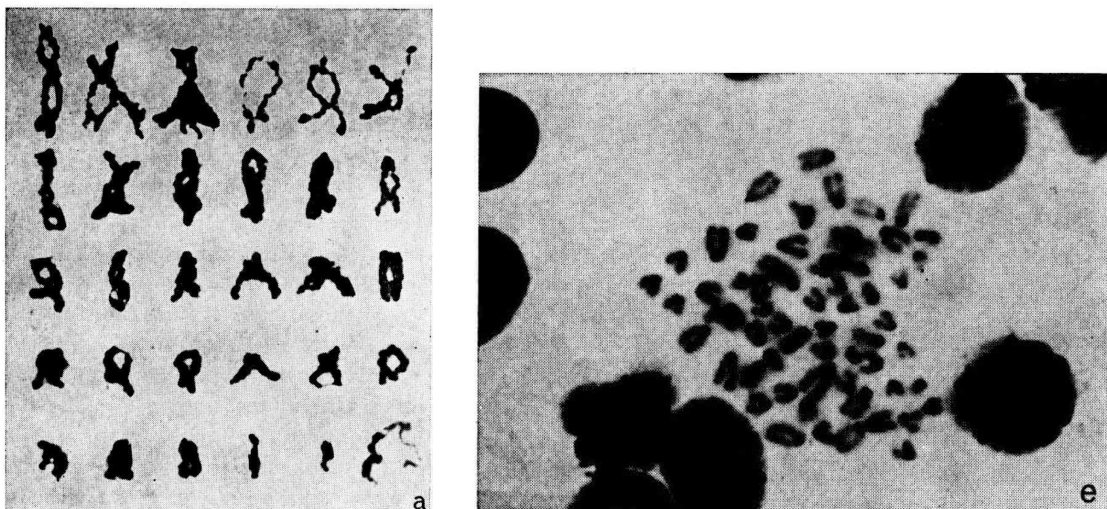
Il existe différentes techniques permettant le sexage des embryons. Ces dernières seront présentées par ordre chronologique de leur apparition et de leur utilisation dans la partie ci-dessous.

A. Technique de sexage au microscope

La technique la moins utilisée et la plus ancienne est celle qui consiste à observer au microscope objectif x1000 les chromosomes après fixation et coloration dans une solution de Giemsa à 4%. Si l'on observe deux chromosomes X dans au moins une métaphase intacte, c'est un embryon femelle. Si l'on observe un chromosome Y, c'est un embryon mâle (Tiffin *et al.*, 1991).

Cette technique est néanmoins peu fiable et ne permet pas de déterminer le sexe de l'embryon dans un grand nombre de cas, notamment du fait de l'absence de cellules en métaphase ou de chromosomes mal répartis ou non analysables (Tiffin *et al.*, 1991).

Figure 6 : (a) Caryotype et (b) cellule en métaphase d'un bovin mâle (Popescu, 1971)



B. Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin

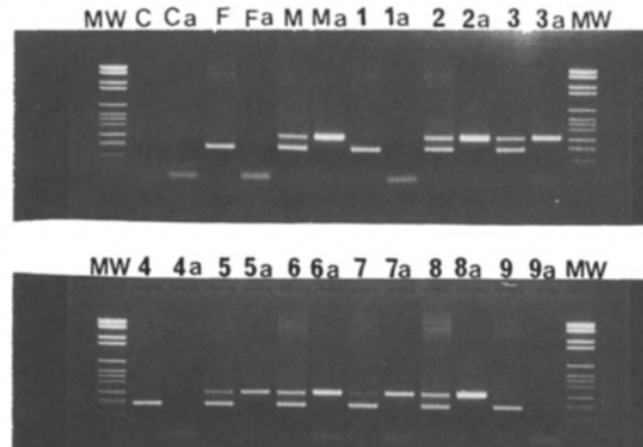
L'amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du chromosome Y bovin est l'une des techniques de sexage la plus utilisée. Cette méthode utilise deux séries d'amorces. La première reconnaît une séquence satellite spécifique aux bovins qui est amplifiée à la fois chez les femelles et les mâles. L'autre reconnaît des séquences spécifiques du chromosome Y bovin qui sont amplifiées uniquement chez les mâles (Peura *et al.*, 1991).

La Figure 7 montre un exemple de sexage de 9 embryons à l'aide de cette technique. MW correspondent à des marqueurs de taille moléculaire, C et Ca sont des échantillons contrôle, ne contenant pas d'ADN. F et Fa contiennent l'ADN extrait des cellules sanguines d'une femelle, Fa étant amplifié en présence d'amorces spécifiques aux mâles uniquement. De même pour les mâles avec M et Ma (Peura *et al.*, 1991).

Les femelles F produisent une seule bande (spécifique aux bovins) et les femelles Fa ne produisent aucune bande car amplifiées uniquement avec les amorces spécifiques au chromosome Y. Les mâles M produisent une double bande (une spécifique aux bovins et l'autre spécifique au chromosome Y) et les mâles Ma, produisent une seule bande car amplifiés uniquement avec les amorces spécifiques au chromosome Y (Peura *et al.*, 1991).

Ainsi, on peut voir sur cet exemple que les embryons 1, 4 et 9 sont des embryons femelles et les embryons 2, 3, 5, 6, 7 et 8 sont des embryons mâles (Peura *et al.*, 1991).

Figure 7 : Électrophorèse sur gel d'agarose d'échantillons bovins amplifiés par PCR (Peura *et al.*, 1991)

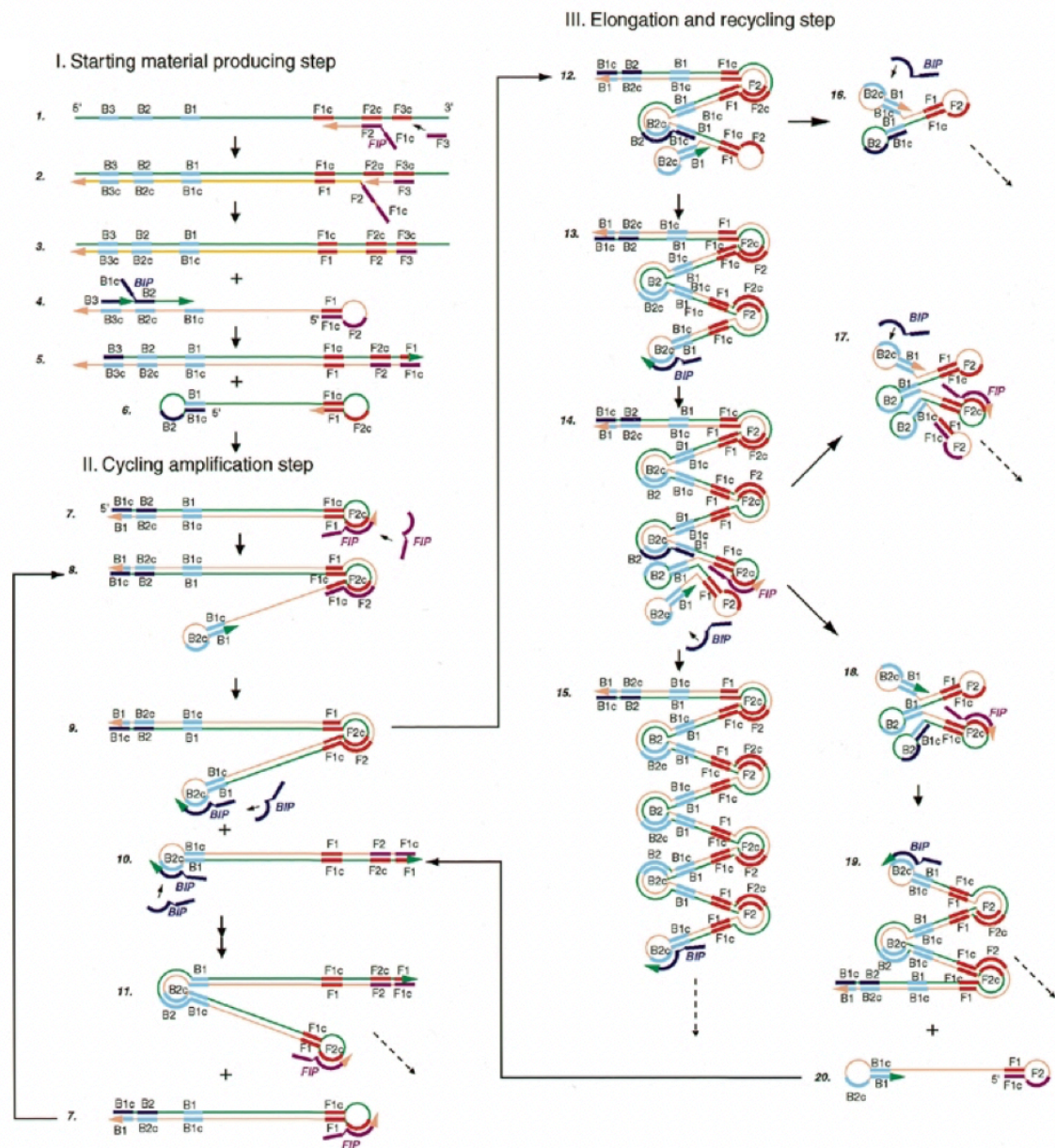


C. Méthode LAMP

La technique de sexage par PCR est utilisée par de nombreux laboratoires. Cependant, cette méthode nécessite des opérations de post-amplification chronophages et des équipements spéciaux. Il existe une autre méthode, appelée amplification isotherme médiée par boucle (LAMP). Elle amplifie une séquence cible d'ADN spécifique dans des conditions isothermes. Elle utilise une ADN polymérase et un ensemble de quatre amorces spécialement conçues qui reconnaissent un total de six séquences distinctes sur l'ADN cible (Notomi *et al.*, 2000).

Cette technique LAMP serait plus rapide et plus sensible que celle par PCR (Hirayama *et al.*, 2004). En effet, il n'est pas nécessaire de dénaturer par la chaleur les matrices d'ADN. De plus, elle ne nécessite pas d'équipement spécial, uniquement un bain-marie de laboratoire ou un bloc chauffant qui fournit une température constante (Agung *et al.*, 2005).

Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme et des différentes étapes de la réaction LAMP (Notomi *et al.*, 2000)



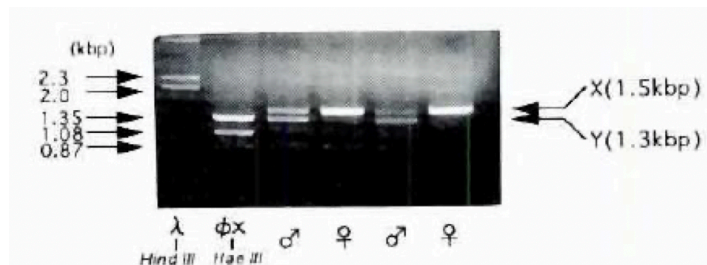
D. Amplification par PCR d'une partie du gène de l'amélogénine

Cette technique est la plus récente, elle se base sur un gène particulier, le gène AMEL. Ce dernier code pour une protéine présente dans la composition de l'émail des dents, l'amélogénine. Le gène AMEL présente deux allèles localisés respectivement sur les chromosomes X (AMELX) et Y (AMELY) (Jeulin, 2022).

L'amplification par PCR d'une partie du gène de l'amélogénine permet de révéler les variations alléliques de ce gène entre le chromosome X et chromosome Y. Le génotypage produit deux amplicons spécifiques : un pour X (AMELX) et un pour Y (AMELY). Lors de la séparation par électrophorèse, deux amplicons distincts seront retrouvés chez l'embryon mâle (XY) alors qu'un seul amplicon sera généré pour l'embryon femelle (XX) (Jeulin, 2022).

Cette technique est illustrée par la Figure 9. Après amplification, les fragments ont été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %. Il apparait deux fragments, un fragment de 1,5 kbp amplifié à partir du chromosome X et un fragment de 1,3 kbp amplifié à partir du chromosome Y (Jeulin, 2022).

Figure 9 : Résultat de l'analyse par PCR des gènes de l'amélogénine sur les chromosomes X et Y (Jeulin, 2022)



E. Comparaison des différentes techniques de sexage

Le tableau 3 compare les avantages et les inconvénients des différentes techniques de sexage utilisées dans la littérature.

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de sexage

Technique	Fiabilité	Rapidité	Coût
Au microscope	Peu fiable voir inutilisable si : absence de cellules en métaphase ou chromosomes mal répartis ou non analysables (Tiffin <i>et al.</i> , 1991).	Chronophage	Peu élevé
Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du chromosome Y bovin	Fiable (Peura <i>et al.</i> , 1991)	Plus rapide que la méthode au microscope (Khamlor <i>et al.</i> , 2015)	Requière des instruments coûteux (Khamlor <i>et al.</i> , 2015)
Méthode LAMP	Plus sensible que la méthode PCR (Hirayama <i>et al.</i> , 2004)	Plus rapide que la méthode PCR (Hirayama <i>et al.</i> , 2004)	Ne nécessite pas d'équipement spécial, uniquement un bain-marie de laboratoire ou un bloc chauffant (Agung <i>et al.</i> , 2005)
Amplification par PCR d'une partie du gène de l'amélogénine	Plus fiable que l'amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin (Trigal <i>et al.</i> , 2012)	Plus rapide que la méthode au microscope	Requière des instruments coûteux

Troisième partie : Le dimorphisme sexuel de l'embryon bovin au cours du développement embryonnaire

Le projet BoSex-Dim axe son étude sur différentes facettes du développement embryonnaire. Nous utiliserons les mêmes approches tout au long de cette partie.

1. Dimorphisme sexuel et morphocinétique du développement embryonnaire

L'objectif, le stade de développement, l'utilisation d'embryon *in vitro* ou *in vivo* et la technique de sexage des articles étudiés dans cette partie est décrite dans le tableau présent en Annexe 3.

a. Existe-t-il des différences morphocinétiques entre les embryons mâles et femelles ?

Il existe des différences de vitesse de développement entre les embryons. Elles dépendent du temps d'ovulation, du temps de fécondation, de la vitesse de développement inhérente à chaque embryon, des conditions de culture *in vitro*, et du sexe. Dans le cas d'embryon fécondés *in vitro*, l'impact de l'ovulation et de la fécondation n'est pas un facteur contributif à la vitesse de développement, puisque le premier clivage est supposé se dérouler au même moment pour tous les embryons fécondés en même temps. De ce fait, il devrait être possible de donner une estimation de l'effet du sexe sur la vitesse de développement embryonnaire (Avery *et al.*, 1992).

L'étude de Avery *et al.* (1991) sur le développement des embryons a permis de mettre en évidence un développement plus rapide des mâles comparé aux femelles au 7ème et 8ème jour après insémination. En effet, au 7ème jour post-insémination, 95% des blastocystes expansés étaient des mâles. De plus la majorité des embryons femelles étaient au stade morula alors que la majorité des mâles étaient au stade blastocyste.

Cependant, dans cette étude, plus de la moitié des embryons n'ont pu être sexés avec la technique de sexage au microscope. L'expérience a donc été renouvelée avec une technique de sexage plus fiable (par amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du chromosome Y bovin) et a permis de confirmer ce résultat (Avery *et al.*, 1992).

Toutefois, les avis sont partagés, certains auteurs n'ont trouvé aucune différence significative, *in vitro*, dans la durée du cycle cellulaire ou dans les intervalles entre l'insémination et la formation de la blastocèle entre les embryons mâles et femelles (Holm *et al.*, 1998 ; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010 a).

Le milieu de culture et notamment la présence de glucose serait un des facteurs mis en cause. En effet, le glucose a un impact sur le développement des embryons (Kimura *et al.*, 2005 ; Larson *et al.*, 2001). Or, il est inclus dans la plupart des milieux de culture, tels que le TCM199, utilisé notamment dans les études d'Avery *et al.* (1991) et d'Avery *et al.* (1992), à des concentrations relativement élevées (5,56 à 6,7 mM) (Peippo *et al.*, 2001).

En effet, en présence de 5,56 mM de glucose, les embryons mâles se divisent plus tôt que les embryons femelles. En moyenne, en présence de glucose, les embryons mâles atteignent le stade 4 cellules 125,6 minutes plus tôt que les embryons femelles. Plus précisément, les embryons femelles atteignaient en moyenne le stade 2 cellules en 29,8 heures et les embryons mâles en 27,3

heures. De plus, les embryons femelles atteignent le stade 4 cellules en 38,2 heures et les embryons mâles en 36,2 heures (Peippo *et al.*, 2001).

Ainsi, une concentration élevée de glucose, 5,56 mM dans cette étude, même présente uniquement pendant les premières 24 heures du développement de l'embryon suffit à biaiser le sex-ratio des morulas et des blastocystes (Peippo *et al.*, 2001).

En 2019, Sidrat *et al.* (2019) ont tenté de comprendre les résultats contradictoires concernant la question des différences de cinétique de développement des embryons mâles et femelles cultivés *in vitro*. Pour cela, ils ont utilisé une technique de sexage des spermatozoïdes en utilisant l'anticorps WholeMom, permettant de fournir un nombre suffisant d'embryons sans endommager le contenu de l'ADN des spermatozoïdes, et un milieu de culture propice, c'est-à-dire proche du liquide utérin *in vivo*, sans la présence de grandes concentrations de glucose pouvant biaiser les résultats, afin de limiter les biais. Ils ont ainsi constaté que l'expansion du blastocyste et le taux d'éclosion étaient systématiquement plus élevés chez les embryons mâles que chez les femelles (Sidrat *et al.*, 2019).

Certains auteurs se sont aussi intéressés aux différences morphologiques entre les embryons mâles et femelles et plus précisément au diamètre de l'embryon et à l'épaisseur de la zone pellucide au stade blastocyste avant expansion. Mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence (Hoelker *et al.*, 2006).

Enfin, les taux d'apoptose des embryons mâles et femelles ont été comparés dans des milieux à base de SOF (contenant du sérum de veau fœtal ou de l'albumine bovine, de l'insuline, de la transferrine et du sélénium) et ont permis de mettre en évidence que les blastocystes bovins femelles sont plus sujets à l'apoptose que les mâles et la taille de l'embryon serait à prendre en compte. En effet, des taux plus élevés de cellules apoptotiques ont été observés chez les embryons femelles, notamment dans les petits blastocystes, quelles que soient les conditions de culture (Ghys *et al.*, 2016 ; Sidrat *et al.*, 2019).

Cependant, on peut se questionner sur le fait de constater des taux plus élevés de cellules apoptotiques principalement dans les petits blastocystes. En effet, un taux élevé d'apoptose conduit à une diminution du nombre de cellules et donc à une diminution de la taille du blastocyste. Ainsi la taille du blastocyste serait une conséquence de l'apoptose et non une cause.

b. Comment expliquer une telle différence ?

Les différences de cinétique de développement entre les embryons mâles et femelles pourraient être générées par des facteurs génétiques et épigénétiques, le taux de métabolisme ou l'activité mitochondriale, qui régulent la production d'ATP (adénosine tri-phosphate) (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008 ; Sidrat *et al.*, 2019).

En effet, l'expression relative de l'ARNm des gènes Oct4 et Igf1-R qui régulent le développement était significativement plus élevée dans le groupe des embryons mâles que celui des femelles. Oct4 est un régulateur majeur de la pluripotence et est fortement exprimé dans les embryons mâles. Selon Sidrat *et al.* (2019), cela expliquerait la tendance plus élevée du ratio de prolifération cellulaire et, par conséquent, entraînerait un développement plus rapide et de meilleure qualité des blastocystes mâles, selon les auteurs. Mais le lien entre pluripotence et vitesse de développement n'est pas clairement expliqué par les auteurs.

De plus, pendant la période préimplantatoire, l'activité des mitochondries est un facteur déterminant de la vitesse de développement entre les sexes (Yang *et al.*, 2018). Une activité mitochondriale élevée contrôle le niveau de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lorsque l'activité mitochondriale est élevée, la conversion des radicaux libres O₂ en oxydants moins toxiques tels que H₂O₂ est plus efficace. Cela permet de maintenir un faible niveau de ROS dans les mitochondries. Un niveau plus élevé de ROS interfère avec la production d'ATP, qui est nécessaire pour soutenir la prolifération cellulaire et la différenciation au cours de la blastulation (Komatsu *et al.*, 2014).

Il a été mis en évidence que les blastocystes mâles présentaient une activité mitochondriale significativement plus élevée et un niveau de ROS plus faible, par rapport aux blastocystes femelles. Le système mitochondrial moins efficace pourrait être à l'origine d'une diminution de la capacité de développement embryonnaire et d'un retard de la vitesse de progression embryonnaire chez les embryons femelles (Sidrat *et al.*, 2019).

Enfin, un taux d'apoptose plus élevé chez les embryons femelles que chez les mâles serait en lien avec le fait que les embryons femelles consomment plus de glucose que les embryons mâles. En effet, une plus grande utilisation du glucose stimule la glycolyse, ce qui perturbe la phosphorylation oxydative en altérant le potentiel de membrane mitochondriale et conduit ensuite à l'activation de l'apoptose par la surproduction de ROS. Il en résulte donc un risque plus élevé d'apoptose et donc un une vitesse de développement plus lente par rapport à leurs homologues masculins (Sidrat *et al.*, 2019).

c. Existe-t-il un impact du choix du taureau sur le sex-ratio ?

Une nouvelle technique, la cinématographie accélérée a permis d'étudier la cinétique de développement des embryons bovins et plus précisément, le moment précis des premiers clivages, de la compaction, de la formation de la blastocèle et de l'éclosion sans compromettre la qualité ou la viabilité des embryons. Cette technique a permis de tester l'effet éventuel du taureau sur le développement et le sexe de l'embryon (Alomar *et al.*, 2008).

En effet, après comparaison entre quatre taureaux différents, il a été montré que seuls les embryons du taureau numéro 3 ont présenté une modification du sex-ratio en faveur des mâles. De plus, le moment du premier clivage était plus précoce avec le taureau 3 qu'avec le taureau 2. Le choix du taureau aurait donc une incidence sur le sex-ratio des embryons bovins et sur la cinétique de développement des embryons (Alomar *et al.*, 2008 ; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010).

Le mécanisme par lequel les spermatozoïdes porteurs du chromosome Y du taureau numéro 3 réussiraient mieux à féconder les ovocytes au début du processus de fécondation n'est pas encore connu (Alomar *et al.*, 2008).

Cependant, les résultats de cette étude sont à considérer avec précaution du fait de l'utilisation d'un nombre restreint de taureaux. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires en utilisant un nombre plus élevé de taureaux et plusieurs éjaculats du même taureau (Alomar *et al.*, 2008).

d. Peut-on utiliser les différences morphocinétiques pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ?

Les différences de cinétique de développement entre les mâles et femelles ne peuvent pas être utilisées de façon fiable pour effectuer un diagnostic de sexe du fait du grand nombre de biais liés à la culture embryonnaire *in vitro* dans les études réalisées jusqu'à présent.

En conclusion

Mise en évidence du dimorphisme sexuel

- *In vitro*, les embryons mâles semblent se développer plus vite que les embryons femelles (Avery *et al.*, 1991, 1992). Cependant, il n'y a pas de consensus sur ce résultat (Holm *et al.*, 1998).
 - Ces résultats seraient biaisés par la présence de glucose dans le milieu de culture qui favoriserait le développement des embryons mâles au détriment des embryons femelles (Peippo *et al.*, 2001).
 - Finalement, une étude plus récente a permis de montrer que l'expansion du blastocyste et le taux d'éclosion est systématiquement plus élevés chez les embryons mâles que chez les femelles (Sidrat *et al.*, 2019).
- Il n'existe aucune différence significative pour le diamètre, l'épaisseur de la zone pellucide et le nombre de cellules des blastocystes mâles et femelles (Hoelker *et al.*, 2006).
- Chez les petits embryons, les femelles présentent un taux d'apoptose plus élevé que les mâles (Ghys *et al.*, 2016 ; Sidrat *et al.*, 2019).

Hypothèses expliquant ce dimorphisme

- Les embryons mâles produits *in vitro* ont une vitesse de développement plus rapide que les embryons femelles en raison de différences dans l'activité mitochondriale, notamment une meilleure protection contre les ROS et la reprogrammation épigénétique (Sidrat *et al.*, 2019).

Choix du taureau et sex-ratio

- Le choix du taureau aurait une incidence sur le sex-ratio des embryons bovins et sur la cinétique de développement des embryons sans que cette différence ne puisse être expliquée jusqu'à présent (Alomar *et al.*, 2008 ; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010 a).

2. Dimorphisme sexuel au cours de l'élongation et de l'implantation

A. Les mécanismes de l'élongation et de l'implantation

a. L'élongation

L'élongation du blastocyste en conceptus nécessite la sécrétion par l'épithélium utérin d'un mélange complexe composé de protéines, de lipides, d'acides aminés, de glucose, de fructose et d'ions. De plus, la progestérone, l'interféron tau, les prostaglandines et le cortisol agissent en synergie pour réguler l'expression de gènes liés à l'élongation et à l'implantation dans les épithéliums endométriaux (Brooks *et al.*, 2014).

La progestérone (P_4), produite par le corps jaune, modifie le milieu intra-utérin, notamment par une augmentation du glucose, de certains acides aminés, des cytokines et des facteurs de croissance, cela favorise l'élongation du blastocyste en un conceptus filamenteux. La progestérone a donc un effet indirect sur le conceptus via l'endomètre (Brooks *et al.*, 2014). De plus, elle induit une accumulation de lipides dans les cellules épithéliales de l'endomètre. Ces derniers sont ensuite transportés et absorbés par les cellules du conceptus et sont la source la plus importante d'acides gras (Ribeiro *et al.*, 2016).

L'interféron tau ($IFN\tau$) est le signal de la reconnaissance maternelle de la gestation. Il est sécrété par le conceptus en élongation avant l'implantation et permet à ce dernier de signaler sa présence au système maternel. En effet, il stimule des signaux lutéotropes (qui stimulent la sécrétion lutéale de progestérone) et antilutéolytiques (qui bloquent la lutéolyse). Pour cela, il inhibe les récepteurs à l'oestradiol, la transcription du gène récepteur de l'ocytocine (OXTR) et active un inhibiteur de la cyclooxygénase, permettant ainsi d'empêcher la libération de $PGF_{2\alpha}$ (effet antilutéolytique). On a donc une production préférentielle de PGE_2 qui a un rôle en tant que signal lutéotrope et lutéoprotecteur ainsi qu'en tant que médiateur de la réceptivité endométriale et de la fonction immunitaire. On obtient alors un maintien du corps jaune et une production continue de P_4 (Arosh *et al.*, 2004 ; Brooks *et al.*, 2014 ; Ledoux, 2011). La sécrétion d' $IFN\tau$ est maximale entre les jours 15 et 17 et on peut le retrouver jusqu'au jour 28 (Hopper, 2021).

Parallèlement, le gène HSD11B1, induit par la P_4 et stimulé par l' $IFN\tau$ et les prostaglandines dans l'endomètre induit la production de cortisol par l'endomètre et le conceptus. Le cortisol est un régulateur essentiel de l'élongation du conceptus via des effets sur la croissance et la survie du trophoctoderme, ainsi que sur l'expression des gènes liés à l'élongation et à l'implantation (Brooks *et al.*, 2014).

b. L'implantation

L'utérus joue un rôle clé, que ce soit dans le processus d'élongation ou d'implantation de l'embryon. Il sécrète des histotrophes qui, associés à des modifications du transcriptome endométrial, déterminent la réceptivité de l'utérus (Rodríguez-Alonso *et al.*, 2020).

Le liquide utérin est un environnement hautement dynamique contenant du plasma sanguin, des protéines endométriales et des cellules épithéliales qui, en renouvellement constant, sont continuellement extrudées dans la lumière. L'embryon et l'utérus de la mère sont en constante communication (Velazquez *et al.*, 2010).

B. Dimorphisme sexuel et interféron tau

L'objectif, le stade de développement, l'utilisation d'embryon *in vitro* ou *in vivo* et la technique de sexage des articles étudiés dans cette partie est décrite dans le tableau présent en Annexe 4.

a. Existe-t-il une différence de production d'IFN τ entre les embryons mâles et femelles ?

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la production d'IFN τ des embryons mâles et femelles produits *in vivo* et *in vitro*, à différents stades de développement (Larson *et al.*, 2001 ; Kimura *et al.*, 2004 a ; Walker *et al.*, 2009 ; Schanzenbach *et al.*, 2019).

In vivo, il a été montré qu'à partir du 8^{ème} jour post-insémination, les embryons femelles produisent presque deux fois plus d'IFN τ que les mâles et cette différence est significative ($p < 0,05$). Plus précisément, les embryons ont été récoltés au jour 8 et 9 de développement puis étudiés après 24h et 48h de culture. À 24 heures de culture les valeurs moyennes étaient, pour les embryons mâles de $16,6 \pm 3,7$ pg/embryon et pour les embryons femelles de $49,4 \pm 9,0$ pg/embryon. À 48h, les embryons mâles avaient produit $189,8 \pm 37,1$ pg/embryon et les femelles $410,9 \pm 66,6$ pg/embryon (Kimura *et al.*, 2004 a).

Cependant, cette différence de production entre les embryons mâles et femelles disparaît à partir du 14^{ème} jour de développement. En effet, au stade conceptus en cours d'élongation, aucune différence significative n'a été observée entre les embryons mâles et femelles (Kimura *et al.*, 2004 a).

In vitro, au stade blastocyste, ce dimorphisme avait été démontré par Larson *et al.* (2001). En effet, les embryons femelles produisaient plus d'IFN τ que les mâles.

b. Comment expliquer une telle différence ?

Deux hypothèses ont été soulevées dans la littérature pour expliquer ce dimorphisme *in vitro*. Soit les blastocystes femelles expriment des variantes plus puissantes de l'IFN τ (Walker *et al.*, 2009), soit elles expriment une plus grande quantité d'IFN τ (Schanzenbach *et al.*, 2019).

Walker *et al.* (2009), se sont intéressés à l'hypothèse que les blastocystes femelles expriment des variantes plus puissantes de l'IFN τ sans pouvoir la confirmer. En effet, les blastocystes femelles n'ont pas exprimé plus de types de transcrits que les blastocystes mâles ($P = 0,543$), ni un groupe différent de transcrits. Les mâles et les femelles exprimaient principalement les IFN τ -1c et 3a.

Le dimorphisme sexuel dans la production d'IFN τ devrait donc résulter d'une augmentation de l'expression globale des IFN τ et non de la présence de variantes différentes d'IFN τ exprimées par les femelles (Walker *et al.*, 2009).

Schanzenbach *et al.* (2019) ont cherché à quantifier la production d'IFN τ dépendante du sexe au niveau transcriptionnel et traductionnel des blastocystes mâles et femelles au 8^{ème} et 10^{ème} jour de culture. Les embryons femelles présentaient un niveau de transcription 5,6 fois plus élevés ($p < 0,0001$) et un niveau de traduction 3,6 fois plus élevés ($p < 0,0001$) que les mâles (Schanzenbach *et al.*, 2019).

De plus, ils ont étudié l'activité biologique des IFN τ à travers la réponse de l'expression des gènes des cellules du stroma endométrial à la suite d'une stimulation dose-dépendante des IFN τ . Les trois gènes stimulés par l'IFN τ étaient : OAS1, ISG15 et MX2.

L'expression de ces trois gènes était plus élevée en présence d'embryons femelles : OAS1 : 1,8 fois ; ISG15 : 2,4 fois et MX2 : 5,2 fois. Cette différence était significative ($p < 0,001$) (Schanzenbach *et al.*, 2019).

Ainsi, l'hypothèse la plus probable est que les blastocystes femelles ont une expression accrue des gènes et des protéines IFN τ , plutôt que d'exprimer des variantes d'IFN τ plus puissantes.

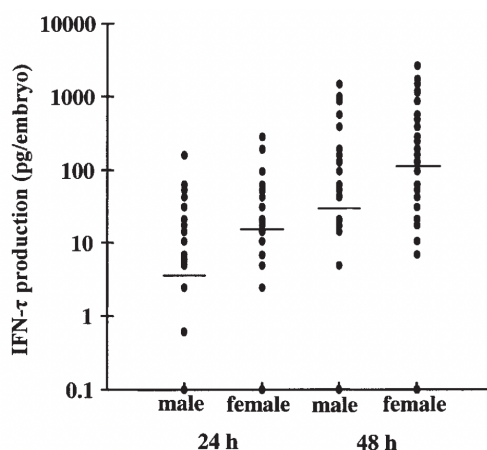
c. Le milieu de culture a-t-il une influence sur le dimorphisme lié à l'IFN τ ?

La production d'IFN τ a été mesurée au stade blastocyste expansé et les embryons ont été cultivés dans des milieux SOF avec et sans glucose. Dans les deux cas, les embryons femelles ont produit plus d'IFN τ que les mâles (après 48 heures de culture 125,4 +/- 13,3 pg/embryon pour les femelles et 73,0 +/- 9,7 pg/embryon pour les mâles, $p < 0,01$) (Kimura *et al.*, 2004 a).

d. Peut-on utiliser ces différences pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ?

Au stade blastocyste, les embryons femelles produisent plus d'IFN τ que les mâles (Kimura *et al.*, 2004 a ; Larson *et al.*, 2001). Cependant, il sera difficile d'utiliser ce paramètre comme moyen non invasif de prédire le sexe de l'embryon en raison de la grande variabilité de production d'IFN τ (Figure 10). De plus, cette différence n'est plus constatée à partir du 14^{ème} jour (Kimura *et al.*, 2004 a).

Figure 10 : Diagramme de dispersion montrant la quantité d'IFN τ (en pg par embryon) produites par les blastocystes mâles et femelles collectés *in vivo* au jour 9 post-insémination après 24 et 48 heures de culture (Kimura *et al.*, 2004 a)



En conclusion

Mise en évidence du dimorphisme sexuel

- Au stade blastocyste, à partir du 8^{ème} jour post fécondation, en excluant le biais du milieu de culture, les embryons femelles produisent plus d'IFN τ que les mâles (Larson *et al.*, 2001 ; Kimura *et al.*, 2004 a).
- La différence disparaît à partir du 14^{ème} jour de développement (Kimura *et al.*, 2004 a).

Hypothèses expliquant ce dimorphisme

- Les blastocystes femelles n'expriment ni plus de types de transcrits que les blastocystes mâles, ni un groupe différent de transcrits (Walker *et al.*, 2009).
- Les blastocystes femelles possèdent un niveau de transcription et un niveau de traduction des IFN τ plus élevé que les mâles (Schanzenbach *et al.*, 2019).

Diagnostic du sexe de l'embryon

- Il est difficile d'utiliser ce paramètre comme moyen non invasif pour prédire le sexe de l'embryon en raison de la grande variabilité de production d'IFN τ (Kimura *et al.*, 2004 a).

3. Dimorphisme sexuel et métabolisme de l'embryon

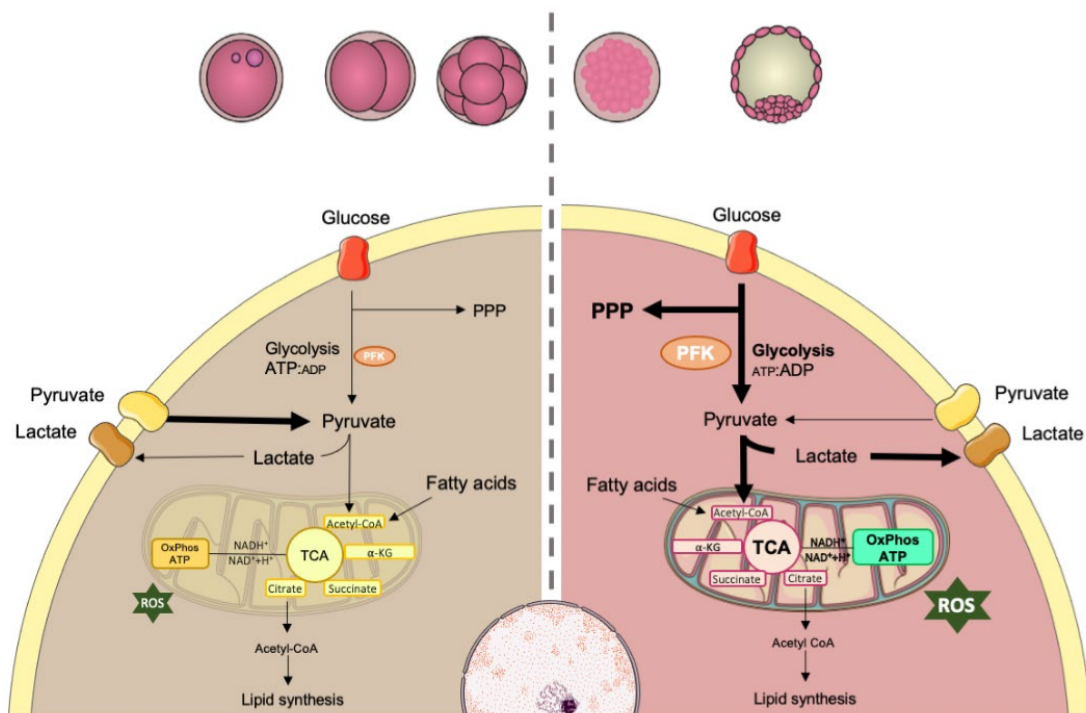
A. Le métabolisme embryonnaire : de la fécondation au stade blastocyste

Le métabolisme de l'embryon, évolue au cours du développement. On distingue principalement deux phases (Figure 11) (Milazzotto *et al.*, 2020).

Lors des premières divisions de clivage, avant la compaction, l'embryon utilise principalement du pyruvate et des acides aminés provenant du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et de la phosphorylation oxydative, sa capacité à utiliser le glucose est limitée. En effet, le rapport ATP / ADP inhibe une enzyme clé de la glycolyse, la phosphofructokinase (PFK) (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014 ; Milazzotto *et al.*, 2020). Jusqu'au stade 8 cellules, la synthèse protéique est relativement constante (Morris *et al.*, 2002).

Par la suite, au stade morula et principalement au moment de la compaction, l'activité métabolique et les besoins en ATP deviennent plus importants, l'embryon augmente sa demande énergétique, entraînant ainsi une augmentation de la consommation de glucose (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014). Le ratio ATP/ADP est alors modifié, ce qui permet à l'embryon de métaboliser le glucose plus efficacement (Guerif *et al.*, 2013). Cela permet l'augmentation de la prolifération et des divisions cellulaires, la synthèse protéique, des échanges d'ions et par la suite la formation et l'expansion du blastocœle conduisant à l'éclosion (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

Figure 11 : Les différentes voies de production d'énergie au cours du développement de l'embryon (Milazzotto *et al.*, 2020)



PFK = Phosphofructokinase / ATP = Adénosine triphosphate / ADP = Adénosine diphosphate / ROS = Espèces réactives de l'oxygène

Le glucose est principalement métabolisé par deux voies : celle des pentoses phosphates (PPP) et la glycolyse (Figure 12). La première permettant la synthèse d'antioxydants et de ribose-5-phosphate conduisant à la production de nucléotides et la deuxième permettant la synthèse d'ATP et de pyruvate. Ce dernier pouvant, par la suite, être transformé en lactate grâce à « l'effet Warburg » (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014 ; Milazzotto *et al.*, 2020).

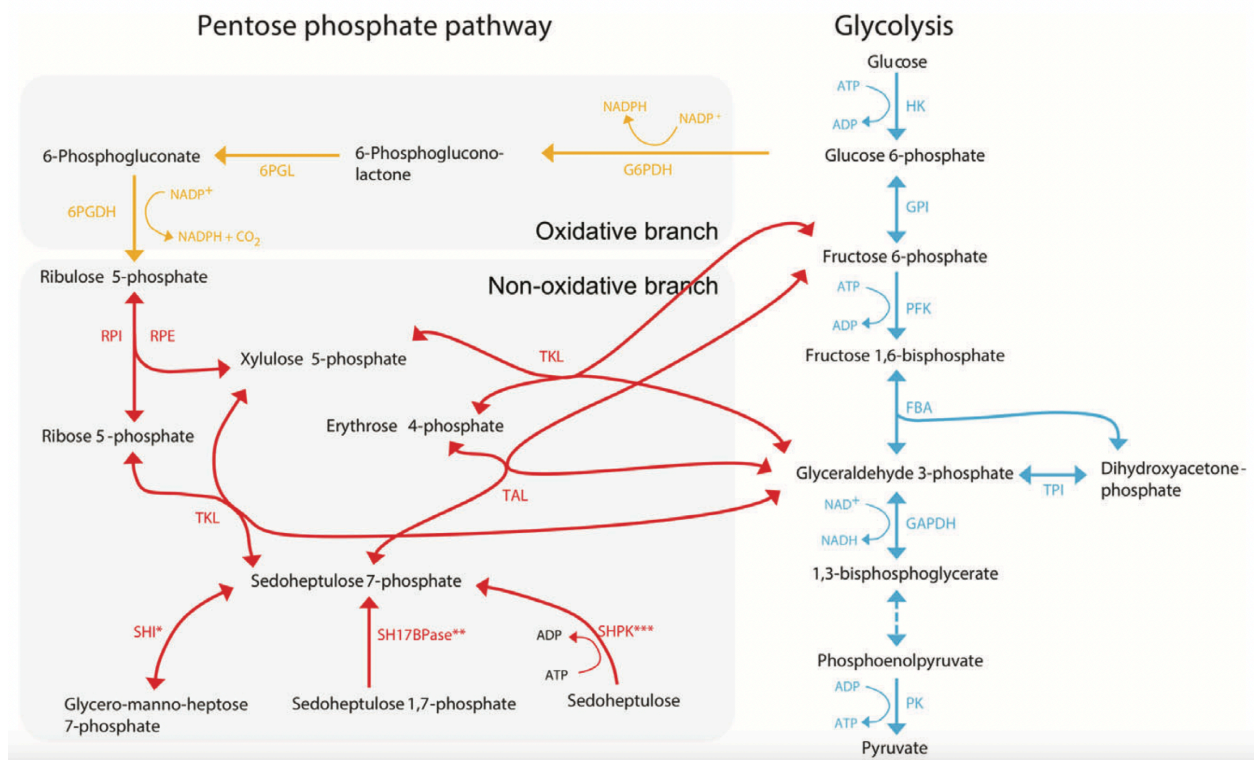
Le transport du glucose à travers les membranes plasmiques des cellules de mammifères est assuré par deux mécanismes différents : le transport actif dépendant du sodium et le transport passif, indépendant de l'énergie, par l'intermédiaire des transporteurs GLUT. Après avoir pénétré dans les cellules embryonnaires, le glucose peut être métabolisé par la glycolyse ou entrer dans la voie des pentoses phosphates (Garcia-Herreros *et al.*, 2012).

Aux alentours du jour 15, on observe un ralentissement du métabolisme, et notamment de la synthèse protéique (Morris *et al.*, 2002).

On constate ainsi une évolution de substrat énergétique en fonction du stade de développement. Cela est corrélé au fait que le milieu de l'oviducte est plus riche en pyruvate et en lactate alors que celui de l'utérus est plus riche en glucose (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

La quasi-totalité de l'ATP constituant l'énergie de l'embryon est produite par voie oxydative dans les mitochondries avec le cycle de l'acide tricarboxylique et la phosphorylation oxydative. Au stade blastocyste, c'est le trophoctoderme qui produit principalement l'ATP (environ 80%) (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

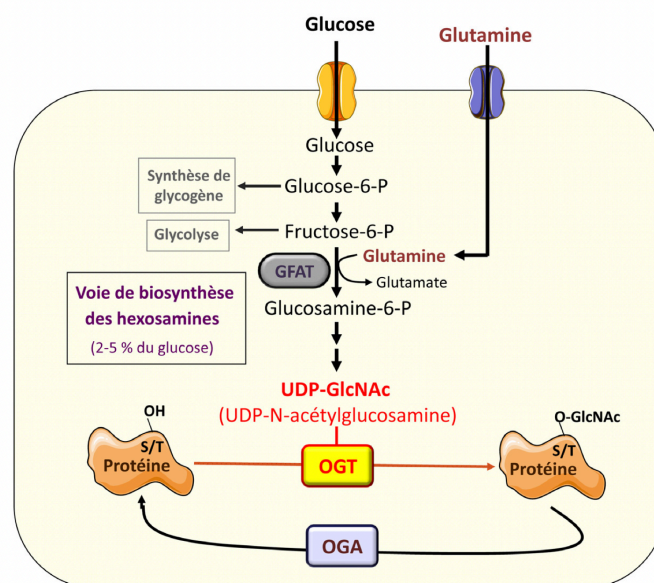
Figure 12 : Voie des pentoses phosphates et glycolyse (Stincone *et al.*, 2015)



Le glucose joue également un rôle important dans la maturation des ovocytes des bovins, il permet notamment la synthèse de la matrice extracellulaire des complexes cumulo-ovocytaires (COC). Le principal composant de la matrice extracellulaire est l'acide hyaluronique. La glucosamine est un composant de l'acide hyaluronique et un substrat alternatif au glucose pour la synthèse de la matrice extracellulaire (Salustri *et al.*, 1989). Sutton-McDowall *et al.* (2004) ont démontré que lorsque la glucosamine est ajoutée au milieu de maturation des bovins, la consommation de glucose par les complexes cumulo-ovocytaires diminue et la majeure partie du glucose est utilisée pour la production de l-lactate via la glycolyse.

La glucosamine est métabolisée en uridine 5-diphospho N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) à partir de fructose 6-P par la voie de biosynthèse de l'hexosamine. Elle est ensuite utilisée par l'enzyme O-linked GlcNAc transférase (OGT) pour réaliser la glycosylation des protéines cytosoliques ou nucléaires (Figure 13). Cette enzyme est importante car elle peut entraîner la glycosylation des résidus sérine et thréonine qui sont normalement phosphorylés, ce qui module l'activité des protéines (Issad et Pagesy, 2014).

Figure 13 : Voie de O-GlcNAcylation des protéines (Issad et Pagesy, 2014)



Les acides aminés jouent un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire, que ce soit pour la synthèse protéique, comme source d'énergie pour le métabolisme, comme précurseur d'acide nucléique, comme régulateur ou encore comme molécules de signalisation (Morris *et al.*, 2002).

Au cours des premiers clivages, la glutamine et l'aspartate, via la voie de transport du malate-aspartate (MAT) sont utilisés pour produire de l'énergie (Milazzotto *et al.*, 2020).

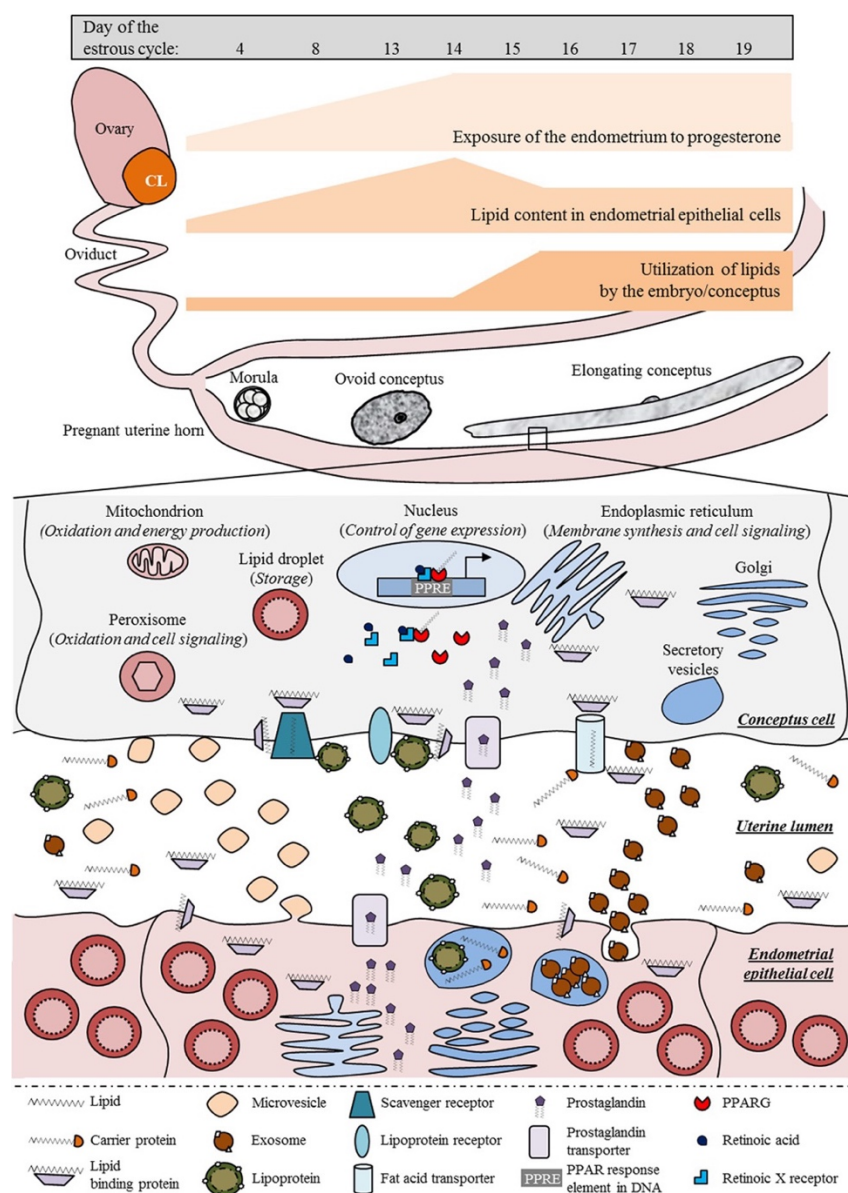
Rubessa *et al.* (2018) ont établi un modèle d'activité métabolique tout au long du développement de l'embryon bovin produit *in vitro*. L'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution (RMN 1H) leur a permis d'étudier l'évolution de six glucides dans le milieu de culture (pyruvate, citrate, formiate, lactate, myo-inositol, acétate) et de neuf acides aminés (alanine, leucine, isoleucine, valine, histidine, tyrosine, lysine, méthionine et phénylalanine) au cours de trois périodes importantes du développement embryonnaire : 1) le développement précoce, avant l'inactivation du chromosome X (du jour 1 au jour 3) ; 2) le développement intermédiaire, avant l'apparition de la masse cellulaire interne et du trophectoderme (du jour 3 jusqu'au jour 5) ; et 3) le développement tardif, lors de la formation du blastocyste (jour 5 jusqu'au jour 7).

Tous les acides aminés évalués suivaient la même tendance : la consommation augmente après le jour 3, ce qui démontre que dans la première phase de développement, les zygotes tirent leurs substrats énergétiques de substrats endogènes (hérités de l'ovocyte) (Rubessa *et al.*, 2018).

Cependant, la consommation des glucides est différente au fil du temps. Les concentrations de myo-inositol et de citrate diminuent au cours du développement tandis que la quantité de pyruvate est constante pour toute la culture embryonnaire. Le métabolisme du formiate change en fonction du stade de développement : la concentration maximale a été trouvée aux jours 3 à 5 lorsque le cycle de Krebs est en pleine activité. Cette modulation s'explique par le fait que le formiate est important pour la synthèse des purines, qui se produit après quelques jours de développement. La concentration en lactate augmente après le 3ème jour de culture (Wallace *et al.*, 2014 ; Rubessa *et al.*, 2018).

Il existe une autre source d'énergie potentielle, les lipides intracellulaires. Par β -oxydation, les acides gras permettent la production d'acétyl-CoA, on a ainsi une modification de l'activité mitochondriale et de la production d'ATP (Sturme *et al.*, 2009). Ils sont aussi utilisés pour la synthèse des membranes cellulaires, la signalisation cellulaire et participent à la coordination de la transcription et de la biologie cellulaire au cours de l'élongation. L'utilisation des lipides par l'embryon augmente à partir du 14^{ème} jour de développement (Figure 14) (Ribeiro *et al.*, 2016).

Figure 14 : Rôle des lipides lors du développement embryonnaire (Ribeiro *et al.*, 2016)



B. Dimorphisme sexuel et métabolites présents dans l'utérus

L'objectif, le stade de développement, l'utilisation d'embryon *in vitro* ou *in vivo* et la technique de sexage des articles étudiés dans cette partie est décrite dans le tableau présent en Annexe 5.

a. Existe-t-il une différence de métabolites entre les liquides utérins contenant un embryon mâle et femelle ?

L'endomètre semble identifier de manière distincte les embryons mâles et femelles (Gómez *et al.*, 2013).

En 2013, une analyse protéomique du liquide utérin au jour 8, prélevé sur des génisses après transfert d'embryons mâles ou femelles produits *in vitro* avec du sperme congelé préalablement sexé, a été réalisée. Pour cela, les embryons ont été transférés dans la corne de génisses, au jour 5 post-fécondation *in vitro* puis récupérées au jour 8. Le liquide utérin a été récupéré après rinçage des cornes utérines des receveuses avec 45 ml de milieu de récupération, composé de PBS + 10 µL/mL d'inhibiteur de protéase. Les embryons ont ensuite été identifiés à l'aide d'un microscope stéréoscopique et ont été rapidement séparés du liquide utérin, qui a été centrifugé (2000g) à 4 °C et stocké à -145 °C (Gómez *et al.*, 2013).

Cette étude a permis d'identifier 23 protéines dont la concentration est plus élevée dans le liquide utérin contenant un embryon femelle par rapport au liquide utérin contenant un embryon mâle. Parmi ces protéines, on peut retrouver des protéines de protéasome / immunoprotéasome (PSME1, PSMA3 et PSMB2), des protéines antioxydantes / anti-stress (PRDX2, PRDX5, PRDX6, TXN, GSTP1 et HSPA5) et plusieurs enzymes impliquées dans la glycolyse (ENO1, ENO3, GPI et PGAM1) (Gómez *et al.*, 2013).

De plus, la concentration du fructose était significativement plus élevée dans le liquide utérin contenant un embryon femelle que celui contenant un embryon mâle ($1,5 \pm 0,4$ µg/mL pour les mâles et $2,7 \pm 0,4$ µg/mL pour les femelles avec un $p < 0,05$) (Gómez *et al.*, 2013).

Ainsi, le sexe de l'embryon induit des modifications précoces du protéome et des glucides présents dans le liquide utérin (constaté à J8) (Gómez *et al.* 2013).

b. Comment expliquer une telle différence ?

Les différences de concentration en hexoses et en enzymes entre les liquides utérins contenant un embryon mâle ou femelle peuvent être expliquées par des besoins nutritionnels différents entre les mâles et les femelles (Gómez *et al.*, 2013).

En conclusion

- Plusieurs protéines et enzymes, notamment impliquées dans la glycolyse, la glycogénèse et les réponses anti-oxydantes sont présentes en plus grande quantité dans le liquide utérin contenant un embryon femelle que celui contenant un embryon mâle (Gómez *et al.*, 2013).

- La concentration de fructose est plus élevée dans le liquide utérin contenant un embryon femelle que dans celui contenant un embryon mâle (Gómez *et al.*, 2013).

C. Dimorphisme sexuel et glucides

L'objectif, le stade de développement, l'utilisation d'embryon *in vitro* ou *in vivo* et la technique de sexage des articles étudiés dans cette partie est décrite dans le tableau présent en Annexe 6.

a. Existe-t-il une différence entre le métabolisme du glucose des embryons mâles et celui des femelles ?

Le métabolisme des glucides et plus précisément celui du glucose est primordial pour le bon déroulement du développement de l'embryon. Un des premiers articles sur le sujet a permis de mettre en évidence qu'*in vivo* le métabolisme du glucose, notamment du D-[5-³H]glucose, des embryons mâles est deux fois plus élevé que celui des embryons femelles ($P < 0,05$) (Tiffin *et al.*, 1991).

À l'inverse, l'activité des pentoses phosphates avec le D-[1-¹⁴C] glucose, était quatre fois plus importante chez les embryons femelles que chez les mâles. De plus, l'activité du cycle de Krebs avec la L-[3,4-³H(N)]glutamine était un tiers plus important chez les embryons femelles que chez les embryons mâles (Tiffin *et al.*, 1991).

Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution car l'étude porte sur un faible nombre d'embryons. En effet, le sexe d'un grand nombre d'embryons n'a pas pu être déterminé du fait de l'absence de cellules en métaphase ou de chromosomes mal répartis ou non analysables (Tiffin *et al.*, 1991).

In vitro, afin de déterminer la différence d'utilisation du glucose entre les blastocystes mâles et femelles, l'expression des gènes GLUT 1, 3 et 4 a été analysée. Elle était significativement plus élevée pour les blastocystes femelles que pour les mâles. Pour les auteurs ce résultat montre que, contrairement aux embryons *in vivo*, les embryons femelles *in vitro* consomment plus de glucose que les embryons mâles (Sidrat *et al.*, 2019). Toutefois, le lien entre consommation de glucose et transporteur n'est pas clairement expliqué par les auteurs. De plus, dans ce cas, la mise en évidence d'une différence entre *in vivo* et *in vitro* est basée sur deux choses différentes. En effet, *in vivo*, c'est la présence de glucose dans le milieu de culture qui est observée alors qu'*in vitro*, les auteurs se sont intéressés au transporteur de glucose GLUT.

Toujours *in vitro*, une différence dans le métabolisme du glucose entre les embryons mâles et femelles a été mise en évidence en introduisant du glucose dans le milieu de culture. Les embryons mâles présentaient 1,25 fois plus de cellules que les embryons femelles ($P = 0,0001$). Cependant, les mécanismes expliquant cette différence n'ont pas été étudiés, seulement le nombre de cellules (Bredbacka et Bredbacka, 1996).

Beaucoup plus récemment, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN 1H) à haute résolution a permis à Rubessa *et al.* (2018) d'étudier les différences de métabolisme entre les embryons mâles et femelles *in vitro* (le glucose n'a pas été étudié dans cette étude). Du jour 1 au jour 3, avant l'inactivation de X et du jour 3 au jour 5, avant l'apparition de la masse cellulaire interne et du trophoctoderme, aucune différence significative du métabolisme des glucides n'a été mise en évidence entre les embryons mâles et femelles. Cependant, entre le jour 5 et le jour 7, lors de la formation du blastocyste, on observe une différence uniquement pour le pyruvate qui est présent en plus grande quantité dans le milieu contenant un embryon femelle que celui des embryons mâles.

b. Comment expliquer une telle différence ?

Le dimorphisme sexuel lié au métabolisme du glucose pourrait être dû à des différences de transcriptions de gènes impliqués dans les principales voies du métabolisme des glucides.

Les principaux gènes étudiés sont, le gène G6PD codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la première enzyme de la voie des pentoses phosphates et le gène PGK codant pour la phosphoglycérate kinase, enzyme clé de la glycolyse (Wrenzycki *et al.*, 2002).

In vivo, aucune différence de transcription de ces deux gènes n'a été constatée entre les embryons mâles et femelles (Wrenzycki *et al.*, 2002).

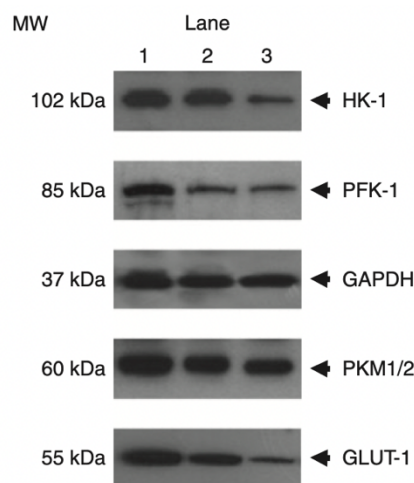
In vitro, la quantité d'ARNm G6PD était significativement plus élevée chez les embryons femelles que chez les mâles, au stade morula et au stade blastocyste. Au stade morula, la quantité d'ARNm du gène PGK était significativement plus élevée chez les embryons femelles que chez les mâles. Cependant, aucune différence significative n'a été observée au stade blastocyste (Wrenzycki *et al.*, 2002).

Ces résultats confirment que le métabolisme des embryons femelles est plus élevé que celui des mâles, notamment au stade morula.

Ces gènes sont situés sur le chromosome X. Chez les embryons femelles, au stade morula, l'inactivation d'un des deux chromosomes X n'a pas encore eu lieu, les deux chromosomes sont donc actifs. Une des hypothèses est que la présence de deux chromosomes X impacte ces deux enzymes et entraîne des différences dans le métabolisme des glucides comparé aux embryons mâles (Kimura *et al.*, 2005 ; Kimura *et al.*, 2008).

Cependant, certains auteurs sont en contradiction avec les résultats présentés précédemment. En effet, en 2012, une étude *in vitro* des principales protéines impliquées dans le métabolisme du glucose des blastocystes bovin au 7^{ème} jour post-insémination a été réalisée. Les protéines étudiées étaient l'hexokinase-I (HK-I), la phosphofructokinase-1 (PFK-1), la pyruvate kinase 1/2 (PKM1/2), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), GLUT-1 et GSK-3 (Figure 15). Garcia-Herreros *et al.* (2012) ont montré que leur expression protéique est significativement plus élevée dans les embryons mâles que dans les femelles.

Figure 15 : Identification de HK-I, PFK-1, PKM1/2, GAPDH et de GLUT-1 dans les blastocystes bovins par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate (Garcia-Herreros *et al.*, 2012)



c. Quel est l'impact du dimorphisme sexuel sur le sex-ratio ?

Outre l'existence de différences de métabolisme entre les embryons mâles et femelles, la présence de glucose dans le milieu de culture *in vitro* a aussi un impact sur le développement des embryons et donc sur le sex-ratio.

De manière générale, les embryons se développent plus difficilement dans un milieu contenant du glucose (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001 ; Larson *et al.*, 2001). Cependant ce n'est pas le cas pour le fructose, un autre glucide impliqué dans la glycolyse. Celui-ci n'a pas d'effet délétère sur le développement des embryons lorsqu'il est présent dans le milieu de culture (Kimura *et al.*, 2005).

Si on s'intéresse plus particulièrement aux différences entre mâles et femelles, aux jours 9 et 10 du développement, on constate un déséquilibre du sex-ratio avec une diminution du nombre d'embryons femelles atteignant le stade blastocyste expansé ($p < 0,05$). La présence de glucose dans le milieu de culture a donc un effet plus délétère sur le développement des embryons femelles que sur celui des mâles (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001 ; Larson *et al.*, 2001). Ce déséquilibre du sex-ratio n'est constaté qu'à partir d'un certain seuil de 2,5 mM de glucose ($p < 0,05$) (Kimura *et al.*, 2005).

Contrairement au glucose, la présence de fructose dans le milieu de culture n'a pas d'effet sur le sex-ratio (Kimura *et al.*, 2005).

Malgré le fait que le glucose soit une source d'énergie majeure pour les cellules somatiques des mammifères, une forte concentration ($> 2,5$ mM) au début du développement peut être délétère pour l'embryon bovin. De plus, il bloque de manière sélective le développement des embryons femelles pendant la transition morula-blastocyste et fausse par conséquent le sex-ratio en faveur des mâles (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001a ; Kimura *et al.*, 2005 ; Larson *et al.*, 2001).

L'ajout d'inhibiteurs de la voie des pentoses phosphates via l'inhibition de la G6PD (la déhydroépiandrostérone (DHEA) et la 6-amino-nicotinamide (6-AN)) dans le milieu de culture a permis un maintien du sex-ratio à une valeur de 0,5 malgré la présence de glucose en grande quantité dans le milieu. Ainsi, l'inhibition de la voie des pentoses phosphates annule les effets du glucose sur le sex-ratio, mais les mécanismes expliquant ce phénomène n'ont pas été étudiés (Kimura *et al.*, 2005).

La glucosamine est un substrat alternatif au glucose pour la synthèse de la matrice extracellulaire. Son ajout dans le milieu de culture entraîne une diminution significative du taux de développement des embryons au stade huit cellules et au stade blastocyste. Cependant, le sex-ratio est modifié en faveur des embryons mâles uniquement lorsque la glucosamine est ajoutée en grande quantité (5mM) et après la transition maternelle zygotique (Kimura *et al.*, 2008).

L'ajout d'un inhibiteur de l'enzyme O-linked GlcNAc Transferase (OGT), la benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -d-galactopyranoside (BADGP), en plus d'une grande quantité de glucosamine dans le milieu de culture, fait disparaître le biais du sex-ratio en faveur des mâles. Cela suggère que la glycosylation liée à l'oxygène est impliquée dans le déséquilibre du sex-ratio (Kimura *et al.*, 2008).

De plus, le gène OGT, comme le gène G6PD impliqué dans le métabolisme du glucose, est situé sur le chromosome X (Shafi *et al.*, 2000). Une des hypothèses est donc qu'une fois le génome embryonnaire activé, la présence de deux chromosomes X actifs entraîne une plus forte expression du gène OGT dans les embryons femelles. Les embryons deviennent plus sensibles au stress métabolique qui peut altérer le statut de glycosylation des protéines importantes pour le développement, telles que les facteurs de transcription (Kimura *et al.*, 2008).

d. Peut-on utiliser ces différences pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ?

L'analyse métabolomique est définie comme une analyse quantitative non ciblée des tissus et des biofluides pour les métabolites organiques endogènes de faible masse moléculaire (Nadal-Desbarats *et al.*, 2013). Les profils métaboliques et leurs changements au fil du temps, en raison de stimuli physiologiques et/ou physiopathologiques fournissent des informations importantes qui aident à comprendre la régulation biologique et les mécanismes physiopathologiques. Les modifications des concentrations des métabolites intracellulaires peuvent être facilement étudiées à l'aide de techniques métabolomiques telles que la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution (RMN 1H). La RMN 1H s'est révélée être l'une des technologies les plus puissantes pour l'analyse métabolomique des fluides biologiques. Elle est capable d'analyser les tissus et les fluides intacts, produisant un profil complet des métabolites (Kumar *et al.*, 2014).

Cette technique a permis d'obtenir un modèle d'activité métabolique au cours du développement de l'embryon bovin et de montrer les différences entre embryon mâle et femelle. De plus, elle a permis de mettre en évidence l'existence d'un indicateur permettant de prédire le sexe de l'embryon. En effet, entre les jours 5 et 7 de culture, le pyruvate présent dans le milieu de culture semble prédire le sexe de l'embryon avec une précision de 64,7 %, une sensibilité de 40 % et une spécificité de 80 % (Figure 17) (Rubessa *et al.*, 2018).

Figure 16 : Fiabilité de la variable pyruvate pour prédire le sexe de l'embryon (Rubessa *et al.*, 2018)

Metabolite	Absolute value				Percentages				
	Correct		Incorrect		Correct	Sensitivity	Specificity	False POS	False NEG
	♀	♂	♀	♂					
Pyruvate	4	12	3	6	64.0	40.0	80.0	42.9	33.3

False POS false positive, *false NEG* false negative

La précision et les valeurs de sensibilité et de spécificité ne sont pas très élevées. En effet, la sensibilité est de 40%, c'est-à-dire que si la concentration de pyruvate indique que l'embryon est une femelle, il y a seulement 40% de chance pour que résultat soit vrai. De plus, la spécificité est de 80%, c'est-à-dire que si la concentration de pyruvate indique que l'embryon n'est pas une femelle, il y a 80% de chance pour que ce soit vrai. Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir utiliser cette méthode pour déterminer le sexe d'un embryon de bovin.

En conclusion

Mise en évidence du dimorphisme sexuel

In vivo :

- Le métabolisme du glucose des embryons mâles est deux fois plus élevé que celui des embryons femelles. Cependant l'activité des pentoses phosphates est quatre fois plus élevé chez les embryons mâles que chez les embryons femelles (Tiffin *et al.*, 1991).

In vitro :

- L'expression des gènes GLUT 1, 3 et 4 est significativement plus élevée pour les blastocystes femelles que pour les mâles (Sidrat *et al.*, 2019).

- En présence de glucose dans le milieu de culture, les embryons mâles présentent un nombre de cellules plus élevé que celui des embryons femelles (Bredbacka et Bredbacka, 1996).

- Entre le jour 5 et le jour 7, lors de la formation du blastocyste, la consommation du pyruvate est plus élevée chez les embryons mâles que chez les femelles (Rubessa *et al.*, 2018).

Hypothèses expliquant ce dimorphisme

- *In vitro*, le gène G6PD est transcrit en plus grande quantité chez les embryons femelles que chez les mâles au stade morula et blastocyste. Aucune différence significative *in vivo* (Wrenzycki *et al.*, 2002).

- *In vitro*, le gène PGK est transcrit en plus grande quantité chez les femelles que chez les mâles au stade morula. Aucune différence significative *in vitro* au stade blastocyste et *in vivo* (Wrenzycki *et al.*, 2002).

- L'expression des protéines glycolytiques (HK-I, PFK-1, GAPDH, PKM1/2), du transporteur de glucose GLUT-1 et de la protéine glycogénétique GSK-3 est plus élevée dans les embryons mâles que dans les embryons femelles (Garcia-Herreros *et al.*, 2012).

Dimorphisme et sex-ratio

- La présence de glucose dans le milieu de culture a un effet délétère sur le développement des embryons femelles (Larson *et al.*, 2001 ; Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001) et le seuil de sensibilité est de 2,5 mM (Kimura *et al.*, 2005).

- Contrairement au glucose, le fructose n'a pas d'effet sur le sex-ratio et n'a pas d'effet délétère sur le développement des embryons (Kimura *et al.*, 2005).

- L'inhibition de la voie des pentoses phosphates permet de corriger la déviation du sex-ratio causé par la présence de glucose en grande quantité dans le milieu de culture (Kimura *et al.*, 2005).

- La présence de glucosamine dans le milieu de culture modifie le sex-ratio en faveur des mâles uniquement lorsqu'elle est ajoutée en grande quantité (5mM) et après la transition maternelle zygotique (Kimura *et al.*, 2008).

- L'inhibition de l'OGT permet de corriger la déviation du sex-ratio causé par la présence de glucosamide en grande quantité dans le milieu de culture (Kimura *et al.*, 2008).

Diagnostic du sexe de l'embryon

- L'analyse métabolomique par spectroscopie RMN 1H est une méthode non invasive avec le potentiel de permettre de déterminer le sexe d'un embryon de bovin (Rubessa *et al.*, 2018).

- Parmi les glucides, le pyruvate est un candidat potentiel. En effet, du jour 5 au jour 7, la concentration de pyruvate est plus élevée dans le milieu de culture contenant un embryon femelle que celui contenant un embryon mâle. Ce paramètre est donc un indicateur permettant de déterminer le sexe de l'embryon (64 % de précision) (Rubessa *et al.*, 2018). Plus d'études seraient nécessaires afin d'améliorer cette précision.

D. Dimorphisme sexuel et acides aminés

Les acides aminés ont un rôle essentiel dans le développement embryonnaire. Ils jouent principalement le rôle de source d'énergie mais agissent aussi comme des osmolytes, des régulateurs du pH, des protecteurs de la viabilité cellulaires et des substrats pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques (Lane, 2001).

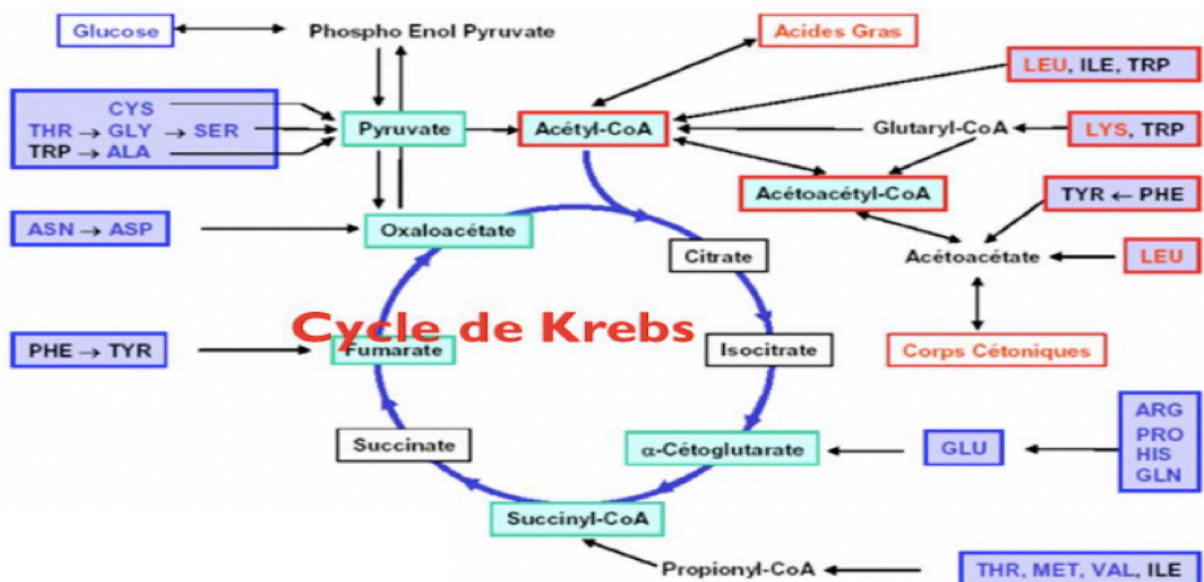
In vitro, les acides aminés ont des effets positifs sur le développement embryonnaire bovin (Van Winkle, 2001). De plus, afin de maintenir un pool d'acides aminés endogènes, les embryons préimplantatoires possèdent des transporteurs d'acides aminés. Cependant, en grande quantité dans le milieu de culture, les acides aminés peuvent avoir un effet délétère sur le développement embryonnaire, notamment par une réduction des taux de clivages (McEvoy *et al.*, 1997).

Le métabolisme des acides aminés se divise en deux grandes catégories, leur synthèse et leur catabolisme (Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2022).

Trois familles d'acides aminés participent au catabolisme dans l'embryon : les acides aminés glucoformateurs qui permettent la synthèse d' α -cétoglutarate, d'oxaloacétate, de fumarate, de succinyl-CoA et de pyruvate. C'est le cas d'acides aminés non essentiels : alanine, asparagine, aspartate, glutamate, glutamine, proline, glycofolle, sérine, cystéine et d'acides aminés essentiels : arginine, histidine, méthionine, thréonine et valine. Les acides aminés cétogènes qui permettent la synthèse d'acétyl-CoA ou d'acétoacétyl-CoA. C'est le cas de la leucine et de la lysine. Et enfin, les acides aminés glucoformateurs et cétogènes tels que la tyrosine (non essentiel), la phénylalanine, le tryptophane et l'isoleucine (essentiels) (Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2022).

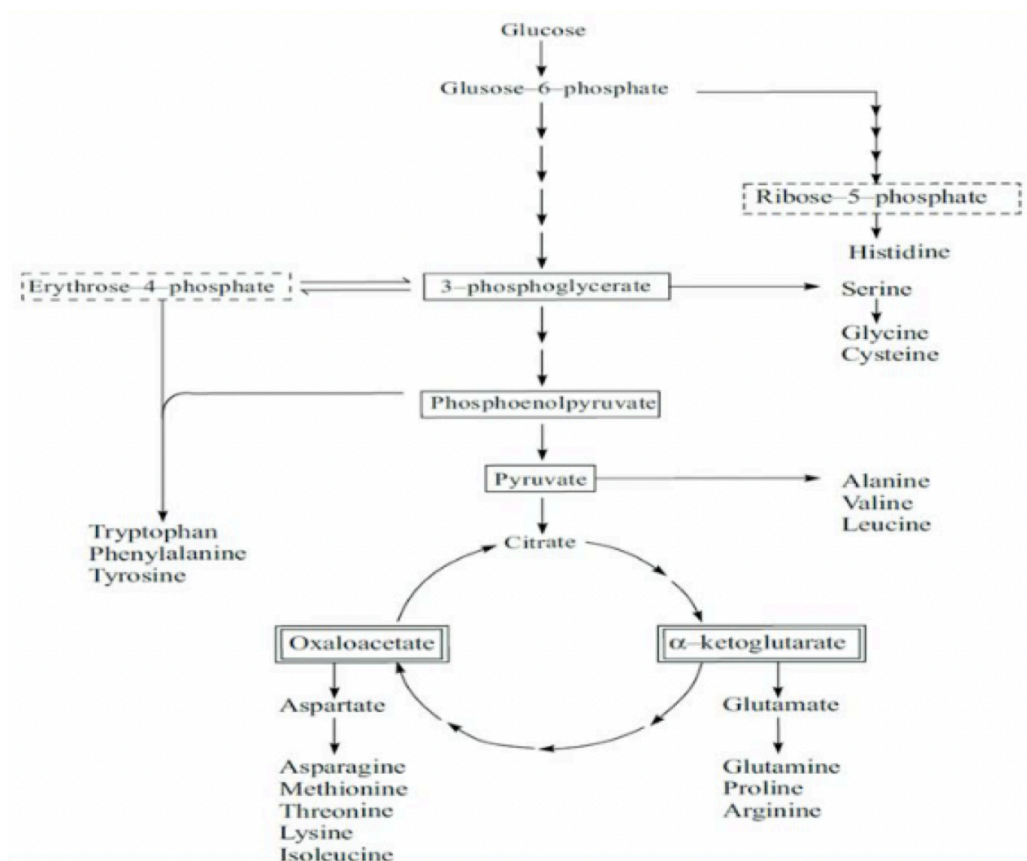
L'importance du catabolisme des acides aminés, notamment dans le cycle de Krebs est rappelé dans la Figure 17. En bleu, les acides aminés glucoformateurs, en rouge, les cétogènes et en noir, les glucoformateurs et cétogènes (Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2022).

Figure 17 : Catabolisme du squelette carboné des acides aminés (Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2022)



Concernant la synthèse des acides aminés. Seuls les acides aminés non essentiels peuvent être synthétisés par l'organisme. Les voies de biosynthèse sont nombreuses mais leur point commun est que le squelette carboné des acides aminés provient des intermédiaires de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates ou du cycle de l'acide citrique (Figure 18) (Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2022).

Figure 18 : Voies de biosynthèse des acides aminés (Université des Frères Mentouri Constantine 1, 2022)



L'objectif, le stade de développement, l'utilisation d'embryon *in vitro* ou *in vivo* et la technique de sexage des articles étudiés dans cette partie est décrite dans le tableau présent en Annexe 7.

a. Existe-t-il une différence dans le métabolisme des acides aminés des embryons mâles et celui des femelles ?

In vitro, au 7^{ème} jour post-fécondation, aux stades blastocyste et blastocyste expansé, une analyse du profil des acides aminés du milieu de culture par chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression (HPLC) a permis de mettre en évidence des différences entre les embryons mâles et femelles (Sturmey *et al.*, 2010). Dix-sept acides aminés ont été étudiés (Alanine, arginine, asparagine, aspartate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine). Sept d'entre eux ont montré une différence de concentration entre les embryons mâles et femelles : arginine, glutamine, méthionine, glycine, phénylalanine, tyrosine et valine. Les augmentations ou diminutions de concentration citées par la suite proviennent de comparaison entre le milieu de culture d'origine et le milieu de culture après avoir contenu un embryon mâle ou femelle pendant 24 heures.

Plus précisément, au stade blastocyste, les auteurs ont constaté dans le milieu de culture des embryons femelles, une déplétion accrue d'arginine ($p < 0,02$), de glutamine ($p < 0,04$) et de méthionine ($p < 0,02$) ainsi qu'une augmentation de la concentration de glycine ($p < 0,04$).

Pour les embryons mâles, une déplétion accrue de la phénylalanine ($p < 0,01$), la tyrosine ($p < 0,03$) et la valine ($p < 0,01$) a été observé.

Les auteurs ont donc fait l'hypothèse que les embryons femelles consomment plus d'arginine, de glutamine et de méthionine mais moins de glycine et les embryons mâles consomment plus de phénylalanine, de tyrosine et de valine (Sturmey *et al.*, 2010). Le lien entre l'augmentation et la diminution de la concentration de ces acides aminés dans le milieu de culture et consommation par les embryons n'a pas été clairement expliqué par les auteurs.

Au stade blastocyste expansé, les différences entre les embryons mâles et femelles ont en grande partie disparues. On retrouve uniquement une augmentation de la glycine ($p < 0,007$) chez les embryons femelles et une déplétion accrue de sérine ($p < 0,02$) chez les embryons mâles (Sturmey *et al.*, 2010).

Cependant, l'étude de Gómez *et al.* (2016), ne trouvent pas les mêmes résultats. Après avoir comparé *in vitro*, au stade blastocyste expansé, les concentrations de méthionine, de thréonine, de tryptophane et de valine entre le milieu de culture d'origine et celui contenant soit un embryon mâle, soit un embryon femelle, les femelles présentaient une augmentation de la thréonine et les mâles présentaient une augmentation de la méthionine et du tryptophane. De plus, ils ont constaté une libération plus importante de valine et de la biotine dans le milieu de culture des embryons mâles. La biotine est un cofacteur responsable du transfert de dioxyde de carbone dans les enzymes carboxylases qui comprennent la propionyl-CoA carboxylase (PCC) et la pyruvate carboxylase (PC). Elle est impliquée dans le métabolisme de la valine (Gómez *et al.*, 2016).

Plus récemment, Rubessa *et al.* (2018), ont étudié le métabolisme des embryons mâles et femelles, *in vitro*. La technique d'analyse utilisée a été la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution (RMN 1H). Plus précisément, la concentration en neuf acides aminés ont été comparée entre les milieux de culture contenant des embryons mâles et ceux contenant des embryons femelles : alanine, leucine, isoleucine, valine, histidine, tyrosine, lysine, méthionine et phénylalanine.

Du jour 3 au jour 5, avant l'apparition de la masse cellulaire interne et du trophoctoderme et du jour 5 au jour 7, lors de la formation du blastocyste, aucune différence significative du métabolisme des acides aminés n'a été mise en évidence entre les embryons mâles et femelles.

Cependant, dans les trois premiers jours du développement, bien avant l'inactivation du chromosome X, on observe une concentration plus faible en valine dans les milieux de culture contenant un embryon femelle que dans ceux contenant un embryon mâle.

Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que les embryons femelles consomment plus de valine que les embryons mâles (Rubessa *et al.*, 2018).

En 2020, Muñoz *et al.* (2020) ont réalisé une analyse quantitative du métabolome de l'interface embryo-maternelle à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (RMN) en combinaison avec un modèle validé de co-culture de cellules endométriales. En effet, les embryons ont été co-cultivés individuellement pendant 48 heures avec soit les cellules épithéliales de l'endomètre, soit les cellules stromales de l'endomètre.

Cette étude a permis d'identifier et de quantifier vingt-six métabolites et ainsi de comparer leur concentration entre des milieux de culture contenant des embryons mâles ou des embryons femelles (Muñoz *et al.*, 2020).

Concernant les milieux de culture contenant des cellules épithéliales de l'endomètre, des différences ont été constatées pour quatre acides aminés : les concentrations en L-Phénylalanine ($p < 0,05$), en L-Tyrosine ($p < 0,05$), en L-Thréonine ($p < 0,05$) et en L-Glycine ($p < 0,05$) étaient significativement plus élevées dans les milieux contenant un embryon femelle que dans ceux contenant un embryon mâle (Muñoz *et al.*, 2020).

Cependant, aucun des métabolites identifiés n'a montré de différence entre mâles et femelles concernant les milieux de culture contenant les cellules stromales de l'endomètre (Muñoz *et al.*, 2020).

Les résultats de ses quatre articles sont contradictoires. Les acides aminés étudiés ne sont pas exactement les mêmes mais la plupart sont présents dans les quatre études. De plus, leurs comparaisons ne sont pas identiques. Sturmeijer *et al.* (2010) et Gómez *et al.* (2016) comparent les concentrations en acides aminés entre le milieu de culture d'origine et le milieu de culture après avoir contenu un embryon mâle ou femelle pendant 24 heures. Rubessa *et al.* (2018) comparent les concentrations en acides aminés entre les milieux de culture contenant un embryon femelle et ceux contenant un embryon mâle. Enfin, Muñoz *et al.* (2020) comparent, dans un premier temps, les concentrations en acides aminés entre les milieux de culture contenant des cellules épithéliales de l'endomètre et un embryon femelle et ceux contenant des cellules épithéliales de l'endomètre et un embryon mâle. Dans un second temps, ils comparent les concentrations en acides aminés entre les milieux de culture contenant des cellules stromales de l'endomètre et un embryon femelle et ceux contenant des cellules stromales de l'endomètre et un embryon mâle.

b. Comment expliquer une telle différence ?

L'une des hypothèses expliquant ce dimorphisme sexuel concernerait l'expression de gènes liés au chromosome X et en particulier le gène de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT). Ce gène est exprimé de manière différente entre les embryons mâles et femelles. Il n'est pas directement lié au métabolisme des acides aminés mais fait partie intégrante des voies de sauvetage des purines. L'augmentation de l'expression de ce gène chez les embryons femelles entraînerait une régulation inappropriée de la purine et conduirait ainsi à une augmentation du besoin en acides aminés afin d'assurer sa biosynthèse (Sturmeijer *et al.*, 2010).

Cependant, en 2020, l'hypothèse inverse est proposée. Selon Muñoz *et al.* (2020), la mise en évidence de concentration significativement plus faibles dans le milieu de culture contenant des cellules épithéliales de l'endomètre et un embryon mâle pour 4 acides aminés (la tyrosine, la thréonine, la phénylalanine et la glycine), suggère que les embryons mâles consomment plus d'acides aminés que les embryons femelles et donc qu'ils ont des besoins plus élevés (Muñoz *et al.*, 2020). Une autre hypothèse serait que les embryons femelles produisent et libèrent plus ces acides aminés dans le milieu que les mâles.

c. Peut-on utiliser ces différences pour effectuer un diagnostic de sexe et quelles en sont les conditions ?

Tout comme pour le métabolisme des glucides, l'analyse métabolomique par spectroscopie RMN 1H a permis de mettre en évidence l'existence d'un indicateur permettant de prédire le sexe de l'embryon. En effet, pendant les trois premiers jours du développement, la valine semble prédire le sexe de l'embryon avec une précision de 66,7 %, une sensibilité de 60 % et une spécificité de 73 % (Figure 18) (Rubessa *et al.*, 2018).

Figure 19 : Classification de la variable de prédiction valine (Rubessa *et al.*, 2018)

Metabolite	Absolute value				Percentages				
	Correct		Incorrect		Correct	Sensitivity	Specificity	False POS	False NEG
	♀	♂	♀	♂					
Valine	9	11	4	6	66.7	60.0	73.3	30.8	35.3

False POS false positive, *false NEG* false negative

La précision et les valeurs de sensibilité et de spécificité ne sont pas très élevées. En effet, la sensibilité est de 60%, c'est-à-dire que si la concentration de pyruvate indique que l'embryon est une femelle, il y a seulement 60% de chance pour que résultat soit vrai. De plus, la spécificité est de 73%, c'est-à-dire que si la concentration de pyruvate indique que l'embryon n'est pas une femelle, il y a 73% de chance pour que ce soit vrai. Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir utiliser cette méthode pour déterminer le sexe d'un embryon de bovin.

En conclusion

Mise en évidence du dimorphisme sexuel

Avant la formation du blastocyste :

- Du jour 1 au jour 3, la concentration de valine est plus faible chez les embryons femelles que chez les mâles (Rubessa *et al.*, 2018).

Au stade blastocyste :

La comparaison entre le milieu d'origine et celui contenant un embryon mâle ou femelle a mis en évidence :

- des différences entre les embryons mâles et femelles pour sept acides aminés : arginine, glutamine, méthionine, glycine, phénylalanine, tyrosine et valine (Sturmey *et al.*, 2010)
- que le milieu de culture des embryons femelles présentait une concentration plus élevée en arginine, glutamine et méthionine mais plus faible en glycine par rapport au milieu d'origine (Sturmey *et al.*, 2010).
- que le milieu de culture des embryons mâles présentait une concentration plus élevée en phénylalanine, tyrosine et valine par rapport au milieu d'origine (Sturmey *et al.*, 2010).

La comparaison des milieux de culture contenant soit un embryon mâle, soit un embryon femelle n'a mis en évidence aucune différence significative (Rubessa *et al.*, 2018).

Enfin Muñoz *et al.*, (2020) ont comparé les milieux de culture contenant soit un embryon mâle soit un embryon femelle avec soit des cellules épithéliales soit des cellules stromales de l'endomètre. Les concentrations en L-Phénylalanine, en L-Tyrosine, en L-Thréonine et en L-Glycine étaient significativement plus élevées dans le milieu contenant des cellules épithéliales d'embryon femelle que celui contenant des cellules épithéliales d'embryon mâle (Muñoz *et al.*, 2020). Cependant, aucun des métabolites étudiés n'a montré de différence entre les milieux contenant des cellules stromales d'embryon mâle et femelle (Muñoz *et al.*, 2020).

Au stade blastocyste expansé :

La comparaison entre le milieu d'origine et celui contenant un embryon mâle ou femelle a mis en évidence :

- Une diminution du dimorphisme sexuel comparé au stade blastocyste (Sturmey *et al.*, 2010).
- Le milieu de culture des embryons femelles présentait une augmentation de la thréonine et celui des mâles présentait une augmentation de la méthionine et du tryptophane ainsi que de la valine et de la biotine (Gómez *et al.*, 2016).

Hypothèses expliquant ce dimorphisme

- Soit les embryons mâles libèrent moins de tyrosine, de thréonine, de phénylalanine et de glycine que les femelles, ce qui pourrait être expliqué par des besoins plus élevés en acides aminés des embryons mâles (Muñoz *et al.*, 2020).
- Soit les embryons femelles produisent plus et donc libèrent ces 4 acides aminés en plus grande quantité dans le milieu.

Diagnostic du sexe de l'embryon

- L'analyse métabolomique par spectroscopie RMN 1H est une méthode non invasive avec le potentiel de permettre de déterminer le sexe d'un embryon de bovin (Rubessa *et al.*, 2018).

- Parmi les acides aminés, la valine est une candidate potentielle. En effet, du jour 1 au jour 3, la concentration de valine est plus faible dans les milieux de culture contenant un embryon femelle que dans ceux contenant un embryon mâle. Ce paramètre est donc un indicateur permettant de déterminer le sexe de l'embryon (66,7 % de précision) (Rubessa *et al.*, 2018). Plus d'études seraient nécessaires afin d'améliorer cette précision.

E. Dimorphisme sexuel et oxygène

L'objectif, le stade de développement, l'utilisation d'embryon *in vitro* ou *in vivo* et la technique de sexage de l'article étudié dans cette partie est décrite dans le tableau présent en Annexe 7.

La consommation d'oxygène d'un embryon peut être quantifiée de manière non invasive par microscopie électrochimique à balayage (SECM) (Shiku *et al.*, 2001). Ce paramètre reflèterait le nombre de cellules ou de mitochondries dans l'embryon (Trimarchi *et al.*, 2000).

Les embryons bovins mâles semblent atteindre le stade blastocyste plus rapidement et avoir plus de cellules que les embryons femelles (Avery *et al.*, 1992). Par conséquent, s'il existe une corrélation entre la consommation d'oxygène et le sexe des embryons bovins produits *in vitro*, l'évaluation non invasive de la consommation d'oxygène de chaque embryon pourrait potentiellement être utilisée comme indicateur prédictif du sexe de l'embryon (Agung *et al.*, 2005).

L'évaluation de la consommation d'oxygène sur des embryons cultivés *in vitro* et étudiés aux jours 7, 8 et 9 de culture a permis de montrer que le taux de consommation d'oxygène des embryons reflète leur qualité mais n'a pas permis de montrer une différence entre les embryons mâles et femelles. Cependant, ces résultats sont à considérer avec précaution du fait du nombre limité d'embryons utilisés (Agung *et al.*, 2005).

En conclusion

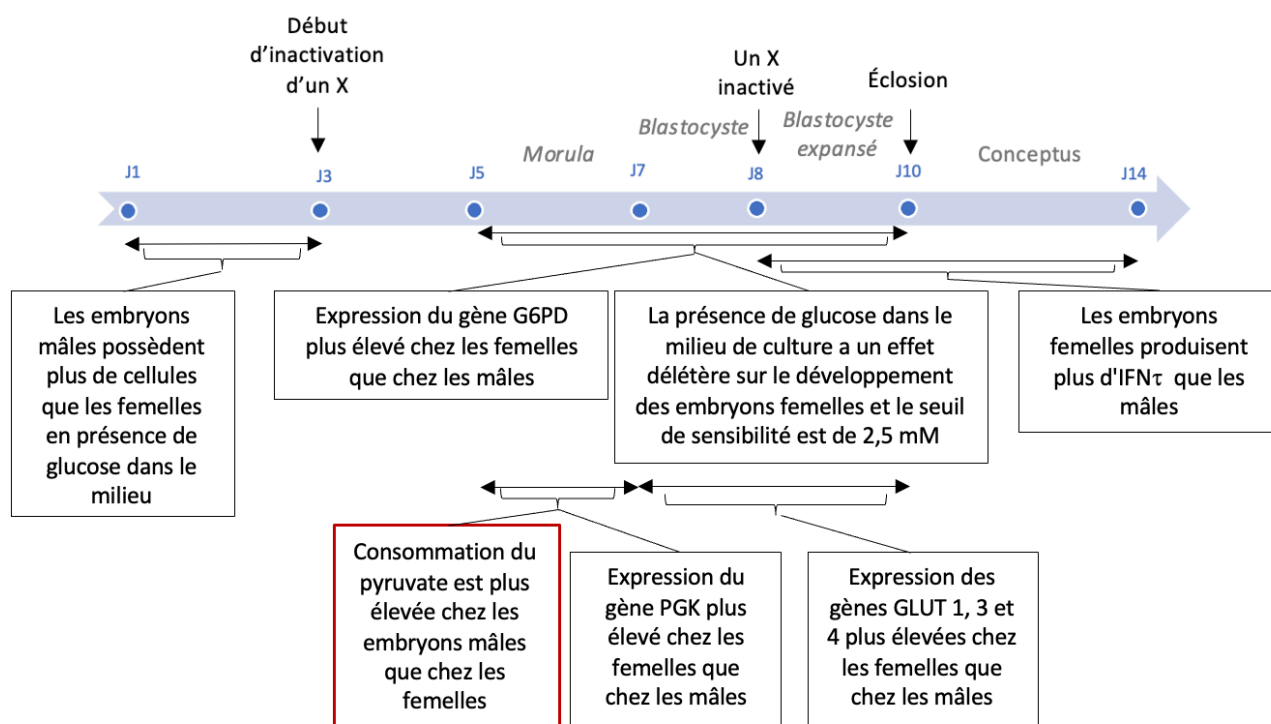
In vitro, il ne semble pas y avoir de différence significative entre le taux de consommation d'oxygène des embryons bovins mâles et femelles (Agung *et al.*, 2005).

Discussion

Depuis 1990, de nombreux auteurs ont étudié le dimorphisme sexuel des embryons de bovins lors du développement *in vitro*. Dans cette thèse nous nous sommes principalement intéressés au dimorphisme sexuel lié à la morphocinétique, la communication materno-embryonnaire avec l'interféron tau et au métabolisme avec les glucides, les acides aminés et l'oxygène. A notre connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée au dimorphisme sexuel de l'embryon concernant les lipides et les acides gras.

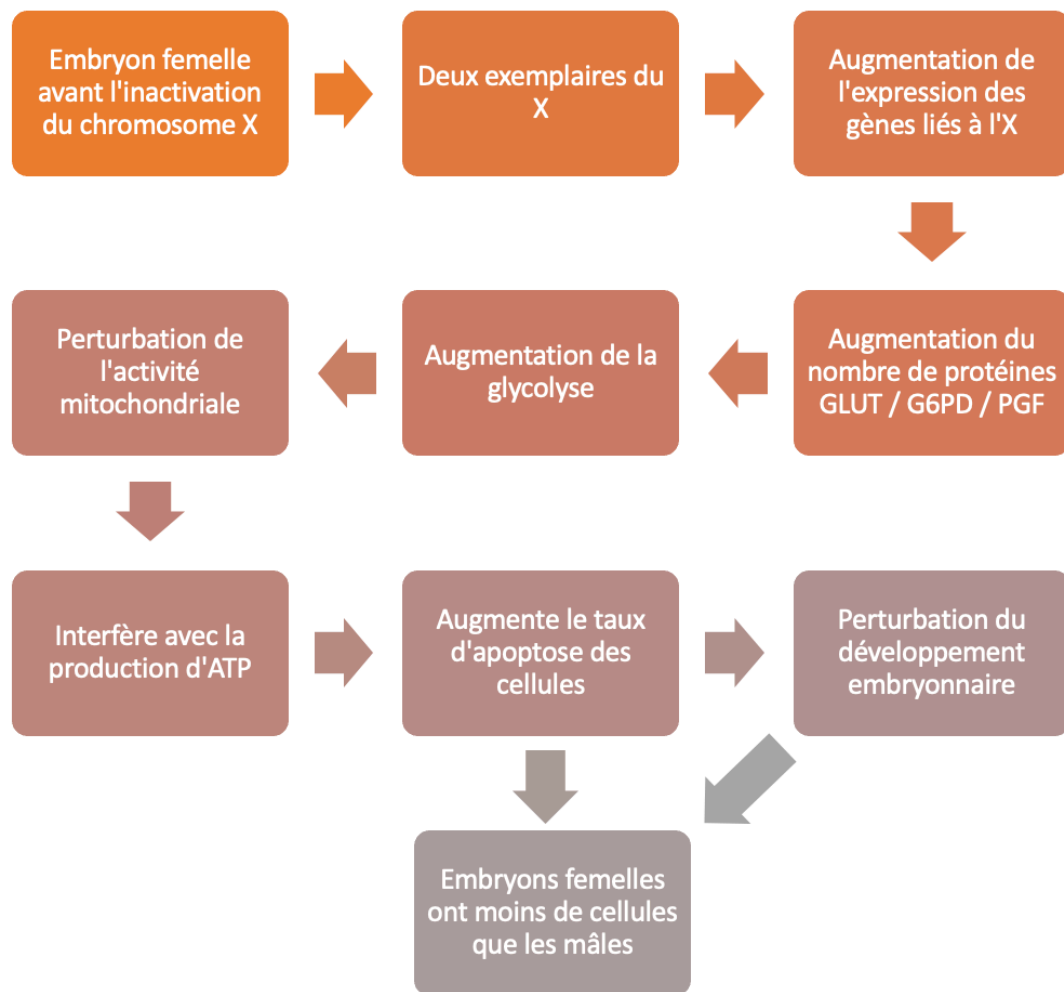
Les résultats significatifs et les hypothèses de cette littérature sont résumés dans les Figures 20 et 21.

Figure 20 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant le dimorphisme sexuel des embryons de bovins au cours des premiers jours de développement *in vitro*



Élément pouvant potentiellement permettre un diagnostic de sexe

Figure 21 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant le dimorphisme sexuel des embryons de bovins au stade jeune blastocyste

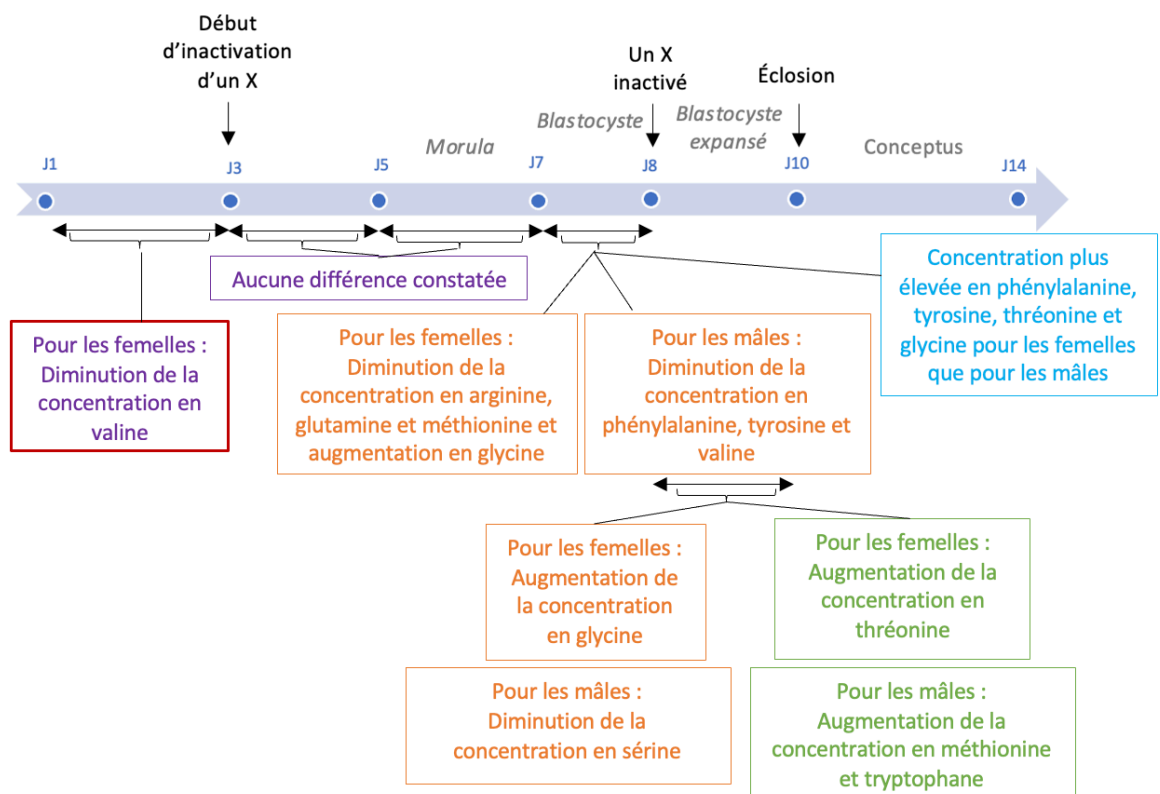


Mais parmi les conclusions des différentes études, certaines étaient contradictoires, elles n'ont donc pas été incluses dans les figures précédentes. C'est notamment le cas des études sur les acides aminés pour lesquels les auteurs ont trouvé des résultats contradictoires (en utilisant des comparaisons différentes), donc, il est difficile de conclure à leur sujet. Les résultats et hypothèses sur ce sujet sont présentés dans la Figure 22.

Les augmentations et diminutions sont celles constatés dans les milieux de culture contenant soit un embryon mâle, soit un embryon femelle. De plus, les résultats présentés sont uniquement ceux qui étaient significatifs.

Les contradictions observées peuvent être dûes aux milieux de culture, aux techniques utilisées ou encore au fait que les acides aminés étudiés n'étaient parfois pas les mêmes.

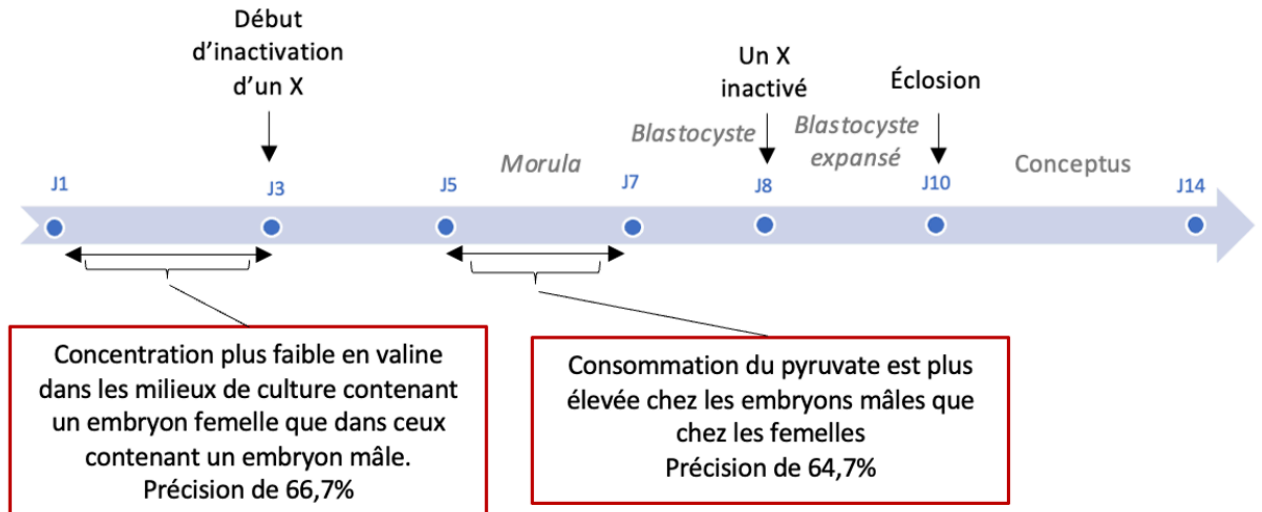
Figure 22 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses concernant le dimorphisme sexuel des embryons de bovins et les acides aminés au cours des premiers jours de développement *in vitro*



- Élément pouvant potentiellement permettre un diagnostic de sexe
- Sturmeijer et al., 2010 (milieu d'origine versus sexe)
- Gómez et al., 2016 (milieu d'origine versus sexe)
- Rubessa et al., 2018 (sexe versus sexe)
- Muñoz et al., 2020 (sexe versus sexe en présence de cellules épithéliales ou de cellules stromales de l'endomètre)

Malgré ces contradictions, les résultats de ces études ont permis de mettre en évidence des indicateurs candidats au diagnostic du sexe de l'embryon. Mais des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir utiliser cette méthode pour déterminer le sexe d'un embryon de bovin. Ces indicateurs sont présentés dans la Figure 23.

Figure 23 : Schéma récapitulatif des indicateurs candidats au diagnostic *in vitro* du sexe de l'embryon



Conclusion

Le dimorphisme sexuel des embryons de bovins au cours des premiers jours de développement a été l'objet d'étude de nombreux articles. Des différences entre les embryons mâles et femelles ont été mises en évidence concernant la morphocinétique et le métabolisme. Cependant, certaines conclusions divergent et se contredisent.

Cela est dû notamment à la grande variation de compositions du milieu de culture *in vitro*, de techniques de culture *in vitro*, mais aussi, plus rarement, à l'existence d'anomalies sex-spécifiques, qui peuvent avoir un impact sur le développement embryonnaire.

Malgré cela, certains auteurs ont voulu mettre en place des techniques non invasives s'appuyant sur le dimorphisme sexuel afin de déterminer le sexe d'un embryon, mais elles sont peu fiables. Des recherches plus approfondies sont nécessaires afin d'obtenir des techniques possédant une sensibilité et une spécificité satisfaisantes.

Liste des références bibliographiques

- AGUNG, B., OTOI, T., ABE, H., *et al.* (2005) Relationship between oxygen consumption and sex of bovine in vitro fertilized embryos. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 40, n° 1, p. 51-56. [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00554.x>]
- ALOMAR, M., TASIAUX, H., REMACLE, S., *et al.* (2008) Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Animal Reproduction Science* vol. 107, n° 1-2, p. 48-61. [<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.009>]
- AROSH, J.A., BANU, S.K., KIMMINS, S., *et al.* (2004) Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology* vol. 145, n° 11, p. 5280-5293. [<https://doi.org/10.1210/en.2004-0587>]
- AVERY, B., JØRGENSEN, C.B., MADISON, V., *et al.* (1992) Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Molecular Reproduction and Development* vol. 32, n° 3, p. 265-270. [<https://doi.org/10.1002/mrd.1080320312>]
- AVERY, B., MADISON, V., GREVE, T. (1991) Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. *Theriogenology* vol. 35, n° 5, p. 953-963. [[https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90306-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90306-x)]
- BEAUJEAN, N., BOUTINAUD, M., DEVINOY, È., *et al.* (2020) L'épigénétique et la construction du phénotype chez le bovin. *INRAE Productions Animales* vol. 33, n° 2. [<https://doi.org/10.20870/productions-animales.2020.33.2.4477>]
- BERMEJO-ALVAREZ, P., LONERGAN, P., RATH, D., *et al.* (2010) Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development* vol. 22, n° 2, p. 426-436. [<https://doi.org/10.1071/RD09142>]
- BERMEJO-ALVAREZ, P., RIZOS, D., RATH, D., *et al.* (2008) Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiological Genomics* vol. 32, n° 2, p. 264-272. [<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00234.2007>]
- BIGGERS, J.D., SUMMERS, M.C. (2008) Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertility and Sterility* vol. 90, n° 3, p. 473-483. [<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.010>]
- BOSEX-DIM (2017) Sexually dimorphic genes and early bovine development: impact of environment. *In Agence Nationale de La Recherche*. [<https://anr.fr/Project-ANR-17-CE20-0029>] (consulté le 14/12/2023).
- BREDBACKA, K., BREDBACKA, P. (1996) Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* vol. 106, n° 2, p. 169-172. [<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060169>]
- BROOKS, K., BURNS, G., SPENCER, T.E. (2014) Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and*

Biotechnology vol. 5, n° 1, p. 53. [<https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-53>]

CHEN, Z., ROBBINS, K.M., WELLS, K.D., *et al.* (2013) Large offspring syndrome. *Epigenetics* vol. 8, n° 6, p. 591-601. [<https://doi.org/10.4161/epi.24655>]

DE LA FUENTE, R., HAHNEL, A., BASRUR, P.K., *et al.* (1999) X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biology of Reproduction* vol. 60, n° 3, p. 769-775. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod60.3.769>]

DEGRELLE, S.A., CAMPION, E., CABAU, C., *et al.* (2005) Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental Biology* vol. 288, n° 2, p. 448-460. [<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.043>]

DURANTHON, V. (2019) L'embryon préimplantatoire: acquis et nouveautés. *Médecine Thérapeutique. Médecine de la Reproduction, Gynécologie, Endocrinologie* vol. 21, n° 1. p. 4-16

FERRÉ, L.B., KJELLAND, M.E., STRØBECH, L.B., *et al.* (2020) Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* vol. 14, n° 5, p. 991-1004. [<https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>]

GAD, A., HOELKER, M., BESENFELDER, U., *et al.* (2012) Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biology of Reproduction* vol. 87, n° 4, p. 100. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099697>]

GARCIA-HERREROS, M., APARICIO, I.M., RATH, D., *et al.* (2012) Differential glycolytic and glycogenogenic transduction pathways in male and female bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility, and Development* vol. 24, n° 2, p. 344-352. [<https://doi.org/10.1071/RD11080>]

GARDNER, D.K. (2008) Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction, Fertility, and Development* vol. 20, n° 1, p. 9-18. [<https://doi.org/10.1071/rd07160>]

GHYS, E., DALLEMAGNE, M., DE TROY, D., *et al.* (2016) Female bovine blastocysts are more prone to apoptosis than male ones. *Theriogenology* vol. 85, n° 4, p. 591-600. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.050>]

GÓMEZ, E., CAAMAÑO, J.N., CORRALES, F.J., *et al.* (2013) Embryonic sex induces differential expression of proteins in bovine uterine fluid. *Journal of Proteome Research* vol. 12, n° 3, p. 1199-1210. [<https://doi.org/10.1021/pr300845e>]

GÓMEZ, E., MUÑOZ, M., SIMÓ, C., *et al.* (2016) Non-invasive metabolomics for improved determination of embryonic sex markers in chemically defined culture medium. *Journal of Chromatography. A* vol. 1474, p. 138-144. [<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.080>]

GUERIF, F., MCKEEGAN, P., LEESE, H.J., *et al.* (2013) A simple approach for Consumption and Release (CORE) analysis of metabolic activity in single mammalian embryos. *PloS One* vol. 8, n° 8, p. e67834. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067834>]

GUIBERT, S., FORNÉ, T., WEBER, M. (2009) Dynamic regulation of DNA methylation during mammalian development. *Epigenomics* vol. 1, n° 1, p. 81-98. [<https://doi.org/10.2217/epi.09.5>]

- GUTIÉRREZ-ADÁN, A., GRANADOS, J., PINTADO, B., *et al.* (2001a) Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reproduction, Fertility, and Development* vol. 13, n° 5-6, p. 361-365. [<https://doi.org/10.1071/rd00039>]
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A., LONERGAN, P., RIZOS, D., *et al.* (2001b) Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* vol. 55, n° 5, p. 1117-1126. [[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00471-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00471-x)]
- HANZEN, C. (2015) La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine. Université de Liège. Faculté de Médecine Vétérinaire. Service de Thériogénologie des animaux de production. In *ULiège.be*. [https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/70626/1/R30_Embryons_invivo_2016.pdf] (consulté le 13/03/2023)
- HIRAYAMA, H., KAGEYAMA, S., MORIYASU, S., *et al.* (2004) Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* vol. 62, n° 5, p. 887-896. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.007>]
- HOELKER, M., SCHMOLL, F., SCHNEIDER, H., *et al.* (2006) Bovine blastocyst diameter as a morphological tool to predict embryo cell counts, embryo sex, hatching ability and developmental characteristics after transfer to recipients. *Reproduction, Fertility, and Development* vol. 18, n° 5, p. 551-557. [<https://doi.org/10.1071/rd05149>]
- HOLM, P., SHUKRI, N.N., VAJTA, G., *et al.* (1998) Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* vol. 50, n° 8, p. 1285-1299. [[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00227-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00227-1)]
- HOPPER, R.M. (2021) Bovine reproduction, 2nd edition. Hoboken, Wiley-Blackwell.
- ISSAD, T., PAGESY, P. (2014) O-GlcNAc glycosylation des protéines et régulation de la signalisation cellulaire : implication en physiopathologie. *Biologie Aujourd'hui* vol. 208, n° 2, p. 109-117. [<https://doi.org/10.1051/jbio/2014015>]
- JEULIN (2022) Notice Jeulin - Kit PCR Détection d'une résistance à un antibiotique.
- KHAMLOR, T., PONGPIACHAN, P., PARNPAI, R., *et al.* (2015) Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* vol. 83, n° 5, p. 891-896. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.025>]
- KIMURA, K., IWATA, H., THOMPSON, J.G. (2008) The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. *Animal Reproduction Science* vol. 103, n° 3-4, p. 228-238. [<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.014>]
- KIMURA, K., SPATE, L.D., GREEN, M.P., *et al.* (2005) Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* vol. 72, n° 2, p. 201-207. [<https://doi.org/10.1002/mrd.20342>]
- KIMURA, K., SPATE, L.D., GREEN, M.P., *et al.* (2004) Sexual dimorphism in interferon- τ production by in vivo-derived bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* vol. 67, n° 2, p. 193-199. [<https://doi.org/10.1002/mrd.10389>]

- KOMATSU, K., IWASE, A., MAWATARI, M., *et al.* (2014) Mitochondrial membrane potential in 2-cell stage embryos correlates with the success of preimplantation development. *Reproduction* vol. 147, n° 5, p. 627-638. [<https://doi.org/10.1530/REP-13-0288>]
- KUMAR, V., DWIVEDI, D.K., JAGANNATHAN, N.R. (2014) High-resolution NMR spectroscopy of human body fluids and tissues in relation to prostate cancer. *NMR in biomedicine* vol. 27, n° 1, p. 80-89. [<https://doi.org/10.1002/nbm.2979>]
- LAMY, J., NOGUES, P., COMBES-SOIA, L., *et al.* (2018) Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. *Reproduction* vol. 155, n° 5, p. 457-466. [<https://doi.org/10.1530/REP-17-0712>]
- LANE, M. (2001) Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology* vol. 55, n° 1, p. 225-236. [[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00456-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00456-8)]
- LAROUSSE, É. (2024) Définition de dimorphisme sexuel - Dictionnaire Larousse. [https://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/dimorphisme_sexuel/43586] (consulté le 15/04/2023).
- LARSON, M.A., KIMURA, K., KUBISCH, H.M., *et al.* (2001) Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN- τ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 98, n° 17, p. 9677-9682. [<https://doi.org/10.1073/pnas.171305398>]
- LAZZARI, G., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., *et al.* (2002) Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction* vol. 67, n° 3, p. 767-775. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004481>]
- LE ROBERT (2024) Définition de sexe-ratio - Dictionnaire Le Robert. [<https://dictionnaire.lerobert.com/definition/sexe-ratio>] (consulté le 03/10/2023).
- LEDOUX, D. (2011) Echecs précoces de gestation chez la vache laitière de race Holstein: incidences, implication dans la baisse de fertilité et facteurs de risque. Thèse de doctorat en Sciences Agricoles . Paris, AgroParisTech. [https://pastel.hal.science/pastel-00777964v2/file/vcompatible_cines_Ledoux.pdf] (consulté le 20/03/2023)
- LONERGAN, P., FAIR, T., CORCORAN, D., *et al.* (2006) Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* vol. 65, n° 1, p. 137-152. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.028>]
- MCEVOY, T.G., ROBINSON, J.J., AITKEN, R.P., *et al.* (1997) Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Animal Reproduction Science* vol. 47, n° 1, p. 71-90. [[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01627-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01627-2)]
- MCGEADY, T.A., QUINN, P.J., FITZPATRICK, E.S., *et al.* (2013) *Veterinary embryology*. Ames (Iowa), Wiley-Blackwell.
- MEMILI, E., FIRST, N.L. (2000) Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* vol. 8, n° 1, p. 87-96. [<https://doi.org/10.1017/s0967199400000861>]
- MILAZZOTTO, M.P., DE LIMA, C.B., DA FONSECA, A.M., *et al.* (2020) Erasing gametes to write

- blastocysts: metabolism as the new player in epigenetic reprogramming. *Animal Reproduction* vol. 17, n° 3, p. e20200015. [<https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0015>]
- MORRIS, D.G., HUMPHERSON, P.G., LEESE, H.J., *et al.* (2002) Amino acid turnover by elongating cattle blastocysts recovered on days 14-16 after insemination. *Reproduction* vol. 124, n° 5, p. 667-673.
- MUÑOZ, M., GATIEN, J., SALVETTI, P., *et al.* (2020) Nuclear magnetic resonance analysis of female and male pre-hatching embryo metabolites at the embryo-maternal interface. *Metabolomics* vol. 16, n° 4, p. 47. [<https://doi.org/10.1007/s11306-020-01672-4>]
- NADAL-DESBARATS, L., VEAU, S., BLASCO, H., *et al.* (2013) Is NMR metabolic profiling of spent embryo culture media useful to assist in vitro human embryo selection? *Magma* vol. 26, n° 2, p. 193-202. [<https://doi.org/10.1007/s10334-012-0331-x>]
- NEGRÓN-PÉREZ, V.M., HANSEN, P.J. (2017) The bovine embryo hatches from the zona pellucida through either the embryonic or abembryonic pole. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* vol. 34, n° 6, p. 725-731. [<https://doi.org/10.1007/s10815-017-0933-3>]
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., *et al.* (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* vol. 28, n° 12, p. E63. [<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>]
- PEIPPO, J., KURKILAHTI, M., BREDBACKA, P. (2001) Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote* vol. 9, n° 2, p. 105-113. [<https://doi.org/10.1017/s0967199401001113>]
- PEURA, T., HYTTINEN, J.M., TURUNEN, M., *et al.* (1991) Reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* vol. 35, n° 3, p. 547-555. [[https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90451-i](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90451-i)]
- POPESCU, C. (1971) Les chromosomes méiotiques du bœuf (*Bos Taurus* L.). *Annales de Génétique et de Sélection Animale* vol. 3, n° 2, p. 125-143. [<https://doi.org/10.1186/1297-9686-3-2-125>]
- RIBEIRO, E.S., SANTOS, J.E.P., THATCHER, W.W. (2016) Role of lipids on elongation of the preimplantation conceptus in ruminants. *Reproduction* vol. 152, n° 4, p. R115-R126. [<https://doi.org/10.1530/REP-16-0104>]
- RIZOS, D., CLEMENTE, M., BERMEJO-ALVAREZ, P., *et al.* (2008) Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 43 Suppl 4, p. 44-50. [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>]
- RIZOS, D., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PÉREZ-GARNELO, S., *et al.* (2003) Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* vol. 68, n° 1, p. 236-243. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>]
- RODRÍGUEZ-ALONSO, B., SÁNCHEZ, J.M., GONZÁLEZ, E., *et al.* (2020) Challenges in studying preimplantation embryo-maternal interaction in cattle. *Theriogenology* vol. 150, p. 139-149. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.019>]
- ROSS, P.J., SAMPAIO, R.V. (2018) Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: cows are

not big mice. *Animal Reproduction* vol. 15, n° 3, p. 204-214. [<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0068>]

RUBESSA, M., AMBROSI, A., GONZALEZ-PENA, D., *et al.* (2018) Non-invasive nuclear magnetic resonance analysis of male and female embryo metabolites during in vitro embryo culture. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society* vol. 14, n° 9, p. 113. [<https://doi.org/10.1007/s11306-018-1414-0>]

SAINT-DIZIER, M., CHASTANT-MAILLARD, S. (2014) *La reproduction animale et humaine*. Versailles, Editions Quae.

SALUSTRI, A., YANAGISHITA, M., HASCALL, V.C. (1989) Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 264, n° 23, p. 13840-13847.

SCHANZENBACH, C.I., BERNAL-ULLOA, S.M., VAN DER WEIJDEN, V.A., *et al.* (2019) Blastocysts exhibit sex-specific signalling of IFNT transcription, translation and activity. *Reproduction* vol. 157, n° 3, p. 245-258. [<https://doi.org/10.1530/REP-18-0312>]

SCHÜBELER, D. (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature* vol. 517, n° 7534, p. 321-326. [<https://doi.org/10.1038/nature14192>]

SHAFI, R., IYER, S.P., ELLIES, L.G., *et al.* (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 97, n° 11, p. 5735-5739. [<https://doi.org/10.1073/pnas.100471497>]

SHIKU, H., SHIRAIISHI, T., OHYA, H., *et al.* (2001) Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Analytical Chemistry* vol. 73, n° 15, p. 3751-3758. [<https://doi.org/10.1021/ac010339j>]

SIDRAT, T., KONG, R., KHAN, A.A., *et al.* (2019) Difference in Developmental Kinetics of Y-Specific Monoclonal Antibody Sorted Male and Female In Vitro Produced Bovine Embryos. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21, n° 1, p. 244. [<https://doi.org/10.3390/ijms21010244>]

SIRARD, M.-A., RICHARD, F., BLONDIN, P., *et al.* (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* vol. 65, n° 1, p. 126-136. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>]

STINCONE, A., PRIGIONE, A., CRAMER, T., *et al.* (2015) The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* vol. 90, n° 3, p. 927-963. [<https://doi.org/10.1111/brv.12140>]

STINSHOFF, H., WILKENING, S., HANSTEDT, A., *et al.* (2011) Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology* vol. 76, n° 8, p. 1433-1441. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.013>]

STRINGFELLOW, D.A., GIVENS, M.D. (2010) *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*, 4th ed. Savoy, International Embryo Transfer Society.

- STURMEY, R.G., BERMEJO-ALVAREZ, P., GUTIERREZ-ADAN, A., *et al.* (2010) Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Molecular Reproduction and Development* vol. 77, n° 3, p. 285-296. [<https://doi.org/10.1002/mrd.21145>]
- STURMEY, R.G., REIS, A., LEESE, H.J., *et al.* (2009) Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 44 Suppl 3, p. 50-58. [<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01402.x>]
- SUTTON-MCDOWALL, M.L., GILCHRIST, R.B., THOMPSON, J.G. (2004) Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* vol. 128, n° 3, p. 313-319. [<https://doi.org/10.1530/rep.1.00225>]
- TIFFIN, G.J., RIEGER, D., BETTERIDGE, K.J., *et al.* (1991) Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *Reproduction* vol. 93, n° 1, p. 125-132. [<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930125>]
- TRIGAL, B., GOMEZ, E., DIEZ, C., *et al.* (2012) Comparative study of PCR-sexing procedures using bovine embryos fertilized with sex-sorted spermatozoa. *Spanish journal of agricultural research* vol. 10, p. 353-359. [<https://doi.org/10.5424/sjar/2012102-447-11>]
- TRIMARCHI, J.R., LIU, L., PORTERFIELD, D.M., *et al.* (2000) Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction* vol. 62, n° 6, p. 1866-1874. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1866>]
- UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1 (2022) Métabolisme des acides aminés. In *UMC.edu.dz* [https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours_Ligne/cours_21_22/Biochimie_A1/Metabolisme_des_acides_aminés.pdf] (consulté le 18/04/2023)
- VAN WINKLE, L.J. (2001) Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biology of Reproduction* vol. 64, n° 1, p. 1-12. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.1>]
- VELAZQUEZ, M.A., PARRILLA, I., VAN SOOM, A., *et al.* (2010) Sampling techniques for oviductal and uterine luminal fluid in cattle. *Theriogenology* vol. 73, n° 6, p. 758-767. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.004>]
- VIANA, J.H. (2022) 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In *IETS.org* [https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf] (consulté le 16/04/2023)
- WALKER, A.M., KIMURA, K., ROBERTS, R.M. (2009) Expression of bovine interferon-tau variants according to sex and age of conceptuses. *Theriogenology* vol. 72, n° 1, p. 44-53. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.017>]
- WALLACE, M., COTTELL, E., CULLINANE, J., *et al.* (2014) (1)H NMR based metabolic profiling of day 2 spent embryo media correlates with implantation potential. *Systems Biology in Reproductive Medicine* vol. 60, n° 1, p. 58-63. [<https://doi.org/10.3109/19396368.2013.854426>]
- WRENZYCKI, C., LUCAS-HAHN, A., HERRMANN, D., *et al.* (2002) In vitro production and nuclear

transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biology of Reproduction* vol. 66, n° 1, p. 127-134. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.127>]

YANG, S.-G., PARK, H.-J., KIM, J.-W., *et al.* (2018) Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. *Scientific Reports* vol. 8, p. 10130. [<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28497-5>]

Annexe 1

Mots et expressions utilisés dans la littérature pour parler de dimorphisme sexuel chez l'embryon de bovin et les articles associés

Mots utilisés	Articles
Sexual dimorphism	(Larson <i>et al.</i> , 2001)
	(Kimura <i>et al.</i> , 2004 a)
	(Walker <i>et al.</i> , 2009)
	(Bermejo-Alvarez <i>et al.</i> , 2010)
	(Sturmey <i>et al.</i> , 2010)
	(Gómez <i>et al.</i> , 2013)
	(Ghys <i>et al.</i> , 2016)
	(Schanzenbach <i>et al.</i> , 2019)
(Muñoz <i>et al.</i> , 2020)	
Sexually dimorphic expression / feature / difference	(Larson <i>et al.</i> , 2001)
Sexually dimorphic feature	(Larson <i>et al.</i> , 2001)
Sexually dimorphic difference	(Larson <i>et al.</i> , 2001)
Differences between male and female embryos / blastocysts / sexes	(Tiffin <i>et al.</i> , 1991)
	(Holm <i>et al.</i> , 1998)
	(Peippo <i>et al.</i> , 2001)
	(Wrenzycki <i>et al.</i> , 2002)
	(Walker <i>et al.</i> , 2009)
	(Garcia-Herreros <i>et al.</i> , 2012)
	(Ghys <i>et al.</i> , 2016)
	(Rubessa <i>et al.</i> , 2018)
(Sidrat <i>et al.</i> , 2019)	
Sex-related differences	(Bredbacka et Bredbacka, 1996)
	(Peippo <i>et al.</i> , 2001)
	(Wrenzycki <i>et al.</i> , 2002)
Sex-dependent differences	(Avery <i>et al.</i> , 1991)
	(Avery <i>et al.</i> , 1992)
	(Sturmey <i>et al.</i> , 2010)
	(Schanzenbach <i>et al.</i> , 2019)
Gender differences	(Larson <i>et al.</i> , 2001)

Annexe 2

Articles s'intéressant aux déviations de sex-ratio pour révéler un dimorphisme

Mot utilisé	Mots utilisés
Sex ratio	(Larson <i>et al.</i> , 2001)
	(Gutiérrez-Adán <i>et al.</i> , 2001)
	(Wrenzycki <i>et al.</i> , 2002)
	(Agung <i>et al.</i> , 2005)
	(Kimura <i>et al.</i> , 2005)
	(Alomar <i>et al.</i> , 2008)
	(Kimura <i>et al.</i> , 2008)
	(Bermejo-Alvarez <i>et al.</i> , 2010)
	(Rubessa <i>et al.</i> , 2018)

Annexe 3

Objectif, stade de développement et technique de sexage des articles étudiés pour la partie dimorphisme sexuel et morphocinétique du développement embryonnaire

Articles	Objectif	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Stade de développement	Technique de sexage
(Avery <i>et al.</i> , 1991)	Déterminer l'existence de différences de vitesse de développement entre les embryons mâles et femelles	<i>In vitro</i>	7ème et 8ème jours après insémination : du stade morula au stade blastocyste expansé	Par caryotypage : Au microscope, après fixation et coloration des embryons dans une solution de Giemsa à 4%
(Avery <i>et al.</i> , 1992)	Déterminer l'existence de différences de vitesse de développement entre les embryons mâles et femelles	<i>In vitro</i>	Du 7 ^{ème} au 10 ^{ème} jour post-insémination : du stade morula au stade blastocyste expansé	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Holm <i>et al.</i> , 1998)	Déterminer l'existence de différences de vitesse de développement entre les embryons mâles et femelles	<i>In vitro</i>	Stades morula et blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Peippo <i>et al.</i> , 2001)	Impact du glucose dans le milieu de culture sur le dimorphisme sexuel lié à la vitesse de développement des embryons de bovins	<i>In vitro</i>	De l'insémination au stade blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Hoelker <i>et al.</i> , 2006)	Déterminer si le diamètre du blastocyste ou l'épaisseur de la zone pellucide diffèrent entre les embryons mâles et femelles	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Alomar <i>et al.</i> , 2008)	Rôle du taureau sur le développement embryonnaire et le sex-ratio	<i>In vitro</i>	De l'insémination au stade blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Bermejo-Alvarez <i>et al.</i> , 2010)	Déterminer s'il existe des différences de vitesse de	<i>In vitro</i>	De l'insémination au stade blastocyste	Sexage des spermatozoïdes

	développement entre les embryons mâles et femelles, si le choix du taureau a un impact sur le sex ratio et si l'abondance des transcrits de certains gènes diffèrent entre les embryons mâles et femelles			par cytométrie de flux
(Ghys <i>et al.</i> , 2016)	Comparer les taux d'apoptose de blastocystes bovins femelles et mâles produits <i>in vitro</i> et cultivés dans différentes conditions	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste	PCR basée sur l'amplification du gène de l'amélogénine
(Sidrat <i>et al.</i> , 2019)	Mettre en évidence les différences de cinétique de développement entre les embryons bovins mâles et femelles et déterminer les facteurs pouvant les expliquer	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste	Sexage des spermatozoïdes à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique au Y, l'anticorps WholeMom L'exactitude a été vérifiée par PCR basée sur l'amplification du gène de l'amélogénine

Annexe 4

Objectif, stade de développement et technique de sexage des articles étudiés pour la partie dimorphisme sexuel et interféron tau

Articles	Objectif	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Stade de développement	Technique de sexage
(Larson <i>et al.</i> , 2001)	Existe-t-il un dimorphisme sexuel concernant la production d'IFN τ chez les embryons de bovins ? Le milieu de culture a un impact ?	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste expansé, 8 ^{ème} jour	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Kimura <i>et al.</i> , 2004 a)	Déterminer s'il existe une variation de la production d'IFN τ entre les embryons mâles et femelles	<i>In vivo</i>	Deux stades étudiés : Stade blastocyste, entre les jours 8,5 et 9,5 Stade conceptus en cours d'élongation, au 14 ^{ème} jour	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Walker <i>et al.</i> , 2009)	Déterminer si les blastocystes mâles et femelles peuvent être distingués en fonction du complément de transcrits qu'ils expriment	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste jour 8 et conceptus jour 11	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Schanzenbach <i>et al.</i> , 2019)	Déterminer les différences entre blastocystes mâles et femelles concernant la transcription embryonnaire, la traduction de l'IFN τ et l'activité biologique de l'IFN τ	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste au 8 ^{ème} et 10 ^{ème} jour	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin

Annexe 5

Objectif, stade de développement et technique de sexage des articles étudiés pour la partie dimorphisme sexuel et métabolites présents dans l'utérus

Articles	Objectif	<i>In vitro / In vivo</i>	Stade de développement	Technique de sexage
(Gómez <i>et al.</i> , 2013)	Analyser le dimorphisme sexuel dans le liquide utérin en réponse aux embryons mâles et femelles	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste (jour 8)	Sexage des spermatozoïdes par cytométrie de flux

Annexe 6

Objectif, stade de développement et technique de sexage des articles étudiés pour la partie dimorphisme sexuel et glucides

Articles	Objectif	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Stade de développement	Technique de sexage
(Tiffin <i>et al.</i> , 1991)	Déterminer l'existence d'une différence entre les embryons bovins mâles et femelles concernant le métabolisme du glucose.	<i>In vivo</i>	Du stade morula au stade blastocyste expansé	Par caryotypage : Au microscope, après fixation et coloration des embryons dans une solution de Giemsa à 4%
(Bredbacka et Bredbacka, 1996)	Déterminer si la présence de glucose dans le milieu de culture entraîne une croissance plus importante des embryons mâles que des embryons femelles chez les bovins.	<i>In vitro</i>	Stade 2 à 4 cellules (environ 48 heures après fécondation)	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Gutiérrez-Adán <i>et al.</i> , 2001)	Déterminer les effets spécifiques du glucose sur le sex-ratio des blastocystes bovins	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste (jours 7, 8, 9 et 10 après fécondation)	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Wrenzycki <i>et al.</i> , 2002)	Déterminer les différences entre les embryons mâles et femelles concernant la transcription de trois gènes liés à l'X, G6PD, PGK et Xist	<i>In vivo et in vitro</i>	Stades morula et blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Kimura <i>et al.</i> , 2005)	Déterminer la concentration seuil à partir de laquelle le glucose a un effet délétère sur le développement	<i>In vitro</i>	Du stade 8 cellules au stade blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin

	<p>des embryons femelles</p> <p>Le fructose a-t-il le même impact que le glucose sur le sex-ratio ?</p> <p>L'ajout d'inhibiteurs de la voie des pentoses phosphates permet-il de corriger les effets du glucose sur le sex-ratio ?</p>			
(Kimura <i>et al.</i> , 2008)	<p>Étudier si la présence de glucosamine, non seulement pendant la maturation mais aussi pendant la période de culture embryonnaire, entraîne une distorsion du sex-ratio des embryons bovins.</p> <p>L'OGT, une enzyme de la glycosylation des protéines, liée à l'X, est-elle impliquée dans ce phénomène ?</p>	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Garcia-Herreros <i>et al.</i> , 2012)	<p>Identifier l'expression protéique des enzymes impliquées dans les voies glycolytiques et glycogéniques (HK-I, PFK-1, PKM1/2, GAPDH, GLUT-1 et GSK-3</p> <p>Comparer l'expression de</p>	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste	Sexage des spermatozoïdes par cytométrie de flux

	<p>ces protéines dans les embryons mâles et femelles</p> <p>Déterminer si la voie glycolytique est régulée par PI3-K dans les embryons de bovins.</p>			
(Rubessa <i>et al.</i> , 2018)	<p>Évaluer le métabolisme d'un embryon de bovin au cours de trois périodes importantes du développement <i>in vitro</i></p>	<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Jour 1 à 3 : du stade une cellule à 4 cellules - Jour 3 à 5 : du stade 4 cellules à morula - Jour 5 à 7 : du stade morula à blastocyste 	<p>Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin</p>

Annexe 7

Objectif, stade de développement et technique de sexage des articles étudiés pour la partie dimorphisme sexuel et acides aminés

Articles	Objectif	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Stade de développement	Technique de sexage
(Sturmeijer <i>et al.</i> , 2010)	Comparaison des profils d'acides aminés des embryons bovins mâles et femelles <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste et blastocyste expansé	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Gómez <i>et al.</i> , 2016)	Mettre en évidence les différences métaboliques entre les embryons mâles et femelles	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste et blastocyste expansé	PCR basée sur l'amplification du gène de l'amélogénine
(Rubessa <i>et al.</i> , 2018)	Évaluer le métabolisme d'un embryon de bovin au cours de trois périodes importantes du développement <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i>	-Jour 1 à 3 : du stade une cellule à 4 cellules -Jour 3 à 5 : du stade 4 cellules à morula -Jour 5 à 7 : du stade morula à blastocyste	Amplification PCR d'une séquence d'ADN spécifique du Y bovin
(Muñoz <i>et al.</i> , 2020)	Déterminer si le métabolome de l'interface embryon-mère (EMI) est modifié par le sexe embryonnaire	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste (jour 8)	PCR basée sur l'amplification du gène de l'amélogénine

Annexe 8

Objectif, stade de développement et technique de sexage des articles étudiés pour la partie dimorphisme sexuel et oxygène

Articles	Objectif	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Stade de développement	Technique de sexage
(Agung <i>et al.</i> , 2005)	Examiner la relation entre le taux de consommation d'oxygène et le sex-ratio d'embryons bovins fécondés <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i>	Stade blastocyste et blastocyste expansé	Méthode LAMP

LE DIMORPHISME SEXUEL CHEZ L'EMBRYON BOVIN

AUTEUR : Ewa PILATH

RÉSUMÉ :

La production d'embryon *in vitro* et le transfert embryonnaire évolue et leur nombre augmente depuis plusieurs années, ce qui pousse la recherche à améliorer la production d'embryons. Le projet BoSex-Dim réalisé par l'équipe EPEE de l'UMR BREED s'intéresse aux différences entre le développement des embryons mâles et femelles et plus précisément, un de leur objectif est d'identifier de manière précoce le dimorphisme sexuel de l'embryon bovin.

Cette thèse s'intéresse, au dimorphisme sexuel morphocinétique et métabolique lors du développement préimplantatoire de l'embryon de bovin. Pour cela un grand nombre d'articles ont été étudiés et une synthèse a été réalisée afin de faire ressortir les principales conclusions existant actuellement sur le sujet.

De nombreuses différences morphocinétiques et métaboliques entre les embryons mâles et femelles ont été mises en évidence. Cependant, certaines conclusions étaient contradictoires. Cela est principalement causé par la grande variation de milieu de culture des embryons *in vitro* qui influence le développement embryonnaire des embryons mâles et femelles de manière différente. Malgré cela, certains auteurs ont réussi à mettre en place des techniques non invasives permettant de déterminer le sexe d'un embryon en utilisant sur le dimorphisme sexuel, mais ces dernières présentaient une sensibilité et une spécificité médiocres. Des recherches plus approfondies sont nécessaires afin d'obtenir des techniques plus fiables.

MOTS CLÉS :

EMBRYON BOVIN - DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE - DIMORPHISME SEXUEL –
MÉTABOLISME - MORPHOCINÉTIQUE

JURY :

Président : Pr Alain FONTBONNE
Directrice de thèse : Dr Alline DE PAULA REIS
Examineur : Pr Laurent TIRET
Invitée : Mme Véronique DURANTHON

SEXUAL DIMORPHISM IN BOVINE EMBRYOS

AUTHOR: Ewa PILATH

SUMMARY:

In vitro embryo production and embryo transfer have been evolving and increasing for several years, prompting research to improve embryo production. The BoSex-Dim project carried out by UMR BREED's EPEE team focuses on the differences between the development of male and female embryos, and more specifically, one of their aims is to identify the sexual dimorphism of the bovine embryo.

This thesis focuses on morphokinetic and metabolic sexual dimorphism during preimplantation development of the bovine embryo. To this end, a large number of articles have been studied and a synthesis has been drawn up to highlight the main conclusions currently available on the subject.

A lot of morphokinetic and metabolic differences between male and female embryos were identified. However, some conclusions were contradictory. This is mainly due to the wide variation in *in vitro* embryo culture media, which influence the embryonic development of male and female embryos in different ways. Despite this, some authors have succeeded in setting up non-invasive techniques to determine the sex of an embryo using sexual dimorphism, but these had poor sensitivity and specificity. Further research is needed to develop more reliable techniques.

KEYWORDS:

BOVINE EMBRYO - EMBRYO DEVELOPMENT - SEXUAL DIMORPHISM – METABOLISM - MORPHOKINETICS

JURY:

Chairperson: Pr Alain FONTBONNE
Thesis Director: Dr Alline DE PAULA REIS
Reviewer: Pr Laurent TIRET
Guest: Mrs Véronique DURANTHON