



Biological Resource Centers  
for Domestic Animals

**3rd International Seminar of CRB-Anim Infrastructure**  
**Domestic Animals, Biobanks and Biodiversity**

November 26th, 2019

**Using morphokinetics as non-invasive method to predict the embryo quality before freezing : the case of the bovine embryo (*EMBRYO\_CRYOMORPH*)**

**Porteur: Alline de Paula Reis, UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France**

**Context:** Aiming at improving the selection of embryos for transfer, our team developed a morphokinetic approach to predict four morphokinetic categories of blastocysts (Reis et al. 2018): EHB, HB, LHB, AB. **The objective** of the project Embryo\_CRYOMORPH was to 1: assess the *in vitro* cryotolerance of these 4 blastocyst categories (Task 1); 2: assess the pregnancy potential of each category (Task 2 and supplementary task); 3: investigate the transcriptional profile of these categories after Embryonic Genome Activation (EGA) (Task 3); 4: supply CRB Anim bank with a batch of 80 blastocysts classified with this new morphokinetic classification (Task 4). **Material and methods:** Bovine embryos were produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries and fertilized *in vitro* (IVF). From 22h after *in vitro* insemination, the embryos were cultured as described by Grimard et al. (2013). During the culture period, photos were taken every 15 minutes to produce the time lapses. The films were annotated and classified as described by LeBrusq (2018) and Reis et al. (2018). For tasks 1, 2, 4 and supplementary task, embryos showing signs of expansion (diameter >135 $\mu$ m and ZP -2 $\mu$ m) were cryopreserved at day 6.2 or 7 post insemination by slow freezing. For tasks 1, 2 and supplementary task embryos were further thawed by direct method (Renard & Heyman, 1982). Task 1: 90 embryos were cultured *in vitro* for 72h to evaluate cryotolerance (survival and hatchability at 24 and 72h of culture), statistical analysis was performed using  $\chi^2$  or Fisher test. Task 2: 4 sessions of transitory transfer (8 embryos / category/session, 1 category / recipient cow) and collection at 15 days after IVF; supplementary task: 27 embryos (6EHB, 7HB, 7LHB, 7AB) were transferred individually into recipient cows, pregnancy diagnostic was performed at D21 (P<sub>4</sub>) and D35, D45, D60 and D90 (ultrasound). Task 3: 128 embryos (pooled into 4 batches of 8 embryos / category (total 16 samples)). Total RNA extracted and amplified using SMARTseq V4 ultralow input kit (Clontech), libraries were prepared using the Nextera XT Illumina library preparation kit and sequenced (Paired-end 50-34 pb) on an Illumina NextSeq500 instrument. Identification of differentially expressed genes: Limma package (R). P-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg false discovery rate (Saenz-de-Juano et al., 2014). Fold change >2 or <0.5 and adjusted p < 0.05 were considered significant. Enrichment analysis was performed using the Web server enrichR. **Results:** Category AB presents atypical morphokinetic and atypical transcriptomic profile *post* EGA, but good cryotolerance (*in vitro* survival rate at 72h (42%), high hatchability (88.9%)) and the highest pregnancy rate (86%). Category LHB presents the lowest *in vitro* survival at 72h (31.3%) but good hatchability (70%), the low survival is consistent with the low pregnancy rate (43%), also, this category presented embryonic losses after D21. Categories EHB and HB present similar morphokinetic profiles. Their hatching potential is impaired after cryopreservation (25% and 50% respectively vs 100% for the fresh counterparts from the learning database) and the pregnancy rates are intermediary to high (67% and 57%, respectively). Transitory embryo transfer highlighted a delay of the embryonic disc development after cryopreservation, but did not show any difference on stage of development between the 4 morphokinetic categories. **Conclusion:** Category AB presents the highest cryotolerance. The EGA profile could be at the origin of this difference. Category LHB presents low *in vitro* survival, low pregnancy rates after cryopreservation and late embryonic losses. Under *in vitro* conditions, cryopreservation reduce the hatching potential of categories EHB and HB.





Biological Resource Centers  
for Domestic Animals

### 3rd International Seminar of CRB-Anim Infrastructure

#### Domestic Animals, Biobanks and Biodiversity

November 26th, 2019

## Utilisation de la morphocinétique comme méthode non invasive de prédiction de la qualité de l'embryon avant la congélation : le cas de l'embryon bovin (*EMBRYO\_CRYOMORPH*)

Porteur: Aline de Paula Reis, UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy en Josas, France

**Contexte :** Dans le but d'améliorer la sélection d'embryons produits *in vitro* pour le transfert, notre équipe a développé une approche permettant de prédire 4 catégories morphocinétiques de blastocystes : EHB, HB, LHB, AB (Reis et al., 2018). L'objectif du projet Embryo\_CRYOMORPH était de : 1) évaluer la cryotolérance *in vitro* (Tâche 1) 2) évaluer le potentiel de gestation (Tâches 2 et supplémentaire) ; 3) investiguer le profil transcriptomique immédiatement après l'activation du génome embryonnaire (EGA) (Tâche 3) ; 4) fournir un batch de 80 embryons classifiés par la morphocinétique à la cryobanque de CRB-Anim. **Matériel et méthodes :** les embryons bovins ont été produits à partir d'ovocytes récupérés sur des ovaires d'abattoir et fertilisés *in vitro* (IVF). A partir de 22h post insémination *in vitro*, les embryons ont été cultivés et des photos ont été prises toutes les 15 minutes pour produire les time-lapses. Les films ont été annotés et classifiés comme décrit par LeBrusq (2018) et Reis et al. (2018). Pour les tâches 1, 2, 4 et tâche supplémentaire, les embryons présentant des signes d'expansion (diamètre >135µm et ZP – 2µm) ont été cryopréservés par congélation lente à 6.2 ou 7.2 jours post insémination. Par la suite, pour les tâches 1, 2 et tâche supplémentaire les embryons ont été décongelés par la méthode directe (Renard et Heyman, 1982). Tâche 1 : 90 embryons ont été cultivés *in vitro* pendant 72h pour l'évaluation de la cryotolérance (survie et éclosion à 24h et 72h), l'analyse statistique a été réalisée avec le test du X<sup>2</sup> ou de Fisher. Tâche 2 : 4 sessions de transfert transitoire (8 embryons / catégorie / session ; 1 catégorie / receveuse) et collectés à J15 post IVF. Tâche supplémentaire : 27 embryons ont été transférés individuellement (6EHB, 7HB, 7LHB, 7AB) et des diagnostics de gestation ont été réalisés à J21 (P<sub>4</sub>), J35, J45, J60, J90 (échographie). Tâche 3 : 128 embryons (pool, 4 lots de 8 embryons / catégorie (total 16 échantillons)). L'ARN total a été extrait et amplifié (SMARTseq V4 ultralow input kit (Clontech)), les bibliothèques ont été préparées (Nextera XT Illumina library preparation kit) et séquencées (Paired-end 50-34 pb) (Illumina NextSeq500). Identification des gènes différentiellement exprimés : Limma package (R). Les p-value ont été ajustées utilisant Benjamini et Hochberg false discovery rate (Saenz-de-Juano et al., 2014). Les Fold change >2 ou <0,5 et p ajusté <0,05 ont été considérés significatifs. L'analyse de l'enrichissement a été réalisée sur le serveur enrichR. **Résultats :** la Catégorie AB présente la morphocinétique et le profil transcriptomique *post* EGA atypiques mais une bonne cryotolérance (survie *in vitro* (42%), éclosion (88,9%)) et un taux de gestation élevé (86%). La catégorie LHB présente la plus faible survie *in vitro* (31,3%) et un bon taux d'éclosion (70%), ce qui est cohérent avec le faible taux de gestation (43%), incluant des pertes embryonnaires tardives (>J21). Les catégories EH et HB présentent un profil morphocinétique proche. Leur potentiel d'éclosion est réduit après la cryopréservation (25% et 50% vs 100% pour les individus frais de la base d'apprentissage) et leur taux de gestation est intermédiaire à élevé (67% et 57% respectivement). Le transfert transitoire en groupe a montré un retard de développement du disc embryonnaire après cryopréservation, mais n'a pas montré de différence de stade de développement entre les 4 catégories morphocinétiques. **Conclusion :** la catégorie AB présente la meilleure cryotolérance. Son profil transcriptomique *post* EGA pourrait être à l'origine de cette différence. La catégorie LHB présente une faible survie *in vitro* et faible taux de gestation après congélation, avec des pertes embryonnaires tardives. La cryopréservation impacte négativement le potentiel d'éclosion *in vitro* des catégories EHB et HB.

