

Faisabilité et premiers résultats lors de la mise en œuvre du typage d'embryons bovins en ferme

Practicability of bovine embryo multi-genotyping under field conditions

LE BOURHIS D. (1), AMIGUES Y. (2), TISSIER M. (3), MOULIN B. (4), LACAIZE S. (5), CHARREAUX F. (6),

FRITZ S. (1), GONZALEZ C. (1), PONSART C. (1), HEYMAN Y. (7), HUMBLLOT P. (1)

(1) UNCEIA - département R&D - 13 rue Jouët - 94704 Maisons-Alfort

(2) LABOGENA - Domaine de Vilvert - 78352 Jouy-en-Josas Cedex

(3) UMOTEST - Les Soudanières - BP 2 - 01250 Ceyzeriat

(4) UCEAR - Bel-Air Embryon - 69340 Francheville

(5) MIDATEST - Les Nauzes - 81580 Soual

(6) GENOE - La Bossière - BP 20080 - 44130 Blain

(7) INRA/ENVA - Biologie du développement et reproduction - 78352 Jouy-en-Josas

INTRODUCTION

L'efficacité de l'insémination artificielle repose sur l'utilisation de schémas d'amélioration génétique basés maintenant sur les apports combinés de la génétique quantitative et de la sélection assistée par marqueurs (SAM). L'émergence des techniques de typage de plus en plus performantes et la mise en œuvre de la sélection multi-caractères peuvent justifier la mise en œuvre du typage des descendants pour les marqueurs de la SAM dès le stade embryonnaire. Cette stratégie offre par ailleurs des possibilités intéressantes pour la sélection précoce des anomalies génétiques ou vis-à-vis de quelques gènes d'intérêt particulier.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. PRODUCTION D'EMBRYONS ET BIOPSIES

Vingt trois femelles ont été superovulées et inséminées en ferme selon le protocole classique (Nibart et Humblot, 1997). Les embryons ont été classés selon le stade (4 : morula, 5 : jeune blastocyste, 6 : blastocyste, 7 : blastocyste épanoui). Seuls les embryons de qualité 1 (Q1) ont été biopsiés. Les biopsies ont été déposées à sec dans un microtube et expédiées jusqu'au laboratoire à température ambiante. Les embryons biopsiés ont été soit transplantés chez des génisses receveuses soit congelés en vue de leur transfert ultérieur.

1.2. GENOTYPAGE

L'ADN génomique de chaque biopsie a été préamplifié par un kit commercial (Repli-G mini kit / Qiagen). Le génotypage de l'ADN a été effectué à LABOGENA sur les marqueurs microsatellites (MS) de la SAM1 (n = 45) et sur des marqueurs SNP (n = 13).

2. RESULTATS

2.1. PRODUCTION D'EMBRYONS

Au total, trois cent sept embryons ont été collectés. Sur cet ensemble, cent quatre-vingt-seize ont été jugés transférables (63,8 %, Q1 et Q2) et cent vingt-deux embryons Q1 ont été biopsiés en ferme.

2.2. DETECTION DE MARQUEURS

L'ADN génomique de quatre-vingt-sept biopsies contenant de quatre à dix cellules issues de cinquante-cinq embryons de stade 4 ou 5 et de trente deux embryons de stade 6 ou 7 a été préamplifié puis génotypé (tableaux 1 et 2). Le reste des biopsies est en cours d'analyse. Les conditions de transport des biopsies du lieu de production (ferme) jusqu'au laboratoire testées lors d'une étude préliminaire ont été reconduites avec succès parce que, d'une part, toutes les biopsies ont été réceptionnées et, d'autre part, chaque tube contenait une biopsie après réception (attesté par la présence d'ADN par PCR, données non montrées).

Tableau 1 : efficacité de détection des 45 marqueurs MS selon le stade des embryons et le nombre de cellules dans la biopsie

Nbre de cellules dans la biopsie	Stade des embryons (nombre d'embryons)	% de biopsies (nbre) selon le nombre de marqueurs MS détectés			
		0-9	10-22	23-44	45
4 - 7	4 et 5 (50)	12%(6)	20%(10)	46%(23)	22%(11)
	6 et 7 (13)	85%(11)	-	7,5% (1)	7,5%(1)
8 - 10	4 et 5 (5)	20%(1)	-	40%(2)	40%(2)
	6 et 7 (19)	74%(14)	21%(4)	-	5%(1)

Tableau 2 : efficacité de détection des 13 marqueurs SNP selon le stade des embryons et le nombre de cellules dans la biopsie

Nbre de cellules dans la biopsie	Stade des embryons (nombre d'embryons)	% de biopsies (nbre) selon le nombre de SNP détectés			
		0-3	4-6	7-12	13
4 - 7	4 et 5 (50)	10%(5)	22%(11)	-	68%(34)
	6 et 7 (13)	62%(8)	-	-	38% (5)
8 - 10	4 et 5 (5)	20%(1)	-	-	80%(4)
	6 et 7 (19)	79%(15)	5%(1)	-	16%(3)

Globalement, après génotypage, pour 10 % des biopsies (n = 9) aucun marqueur n'a été révélé. Dans l'ensemble, les résultats font apparaître des taux de détection significativement plus faibles pour les marqueurs MS par rapport aux marqueurs SNP: 17 % des biopsies (15 / 87) ont été typées sur tous les marqueurs MS contre 53 % des biopsies (46 / 87) sur tous les marqueurs SNP (P < 0,01). D'autre part, pour les deux types de marqueurs, ces résultats de typages mettent en évidence des effets combinés de la taille de la biopsie et du stade de l'embryon. Les taux de détection des marqueurs sont supérieurs (P < 0,05) pour les biopsies de petites tailles (4 à 7 cellules) prélevées sur des embryons de stade morulae ou jeune blastocyste (tableaux 1 et 2) comparés à ceux détectés sur des biopsies contenant 8 à 10 cellules prélevées sur des embryons de stade blastocyste et blastocyste épanoui.

CONCLUSION

A ce stade, il est encore trop tôt pour valider complètement les résultats ; les études complémentaires en cours sur les effets de la taille de la biopsie et le stade de l'embryon devraient apporter les éléments nécessaires à l'analyse. A l'issue de ce travail, les résultats des typages réalisés à partir du matériel embryonnaire seront comparés à ceux obtenus sur les veaux nés.

Nibart M., Humblot P. 1997. *Theriogenology*, 47, 371