

1974-2014: quelle place pour l'embryon à l'ère de la génomique chez les ruminants ?

PONSART C. (1, 2), GAMARRA G. (2, 3), LACAZE S. (3), MERMILLOD P. (4), LE BOURHIS D. (2), GRIMARD B. (5, 6)

(1) ANSES, Laboratoire de Santé Animale, 23 ave du Général de Gaulle, 94706 MAISONS-ALFORT

(2) UNCEIA, 149 rue de Bercy, 75595 PARIS cedex 12

(3) MIDATEST, Domaine de Sensacq, 64230 DENGUIN

(4) INRA, Centre de recherche Val de Loire, Physiologie de la reproduction, 37380 NOUZILLY

(5) ENVA, Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, 7 av du général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex;

(6) INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex;

RESUME

Au cours des dix dernières années, les échanges internationaux d'embryons ont doublé. Le transfert embryonnaire reste un des moyens les plus sûrs pour échanger du matériel génétique. Optimiser les techniques de reproduction est devenu un axe stratégique à l'ère de la génomique : l'amélioration du progrès génétique peut être accélérée grâce à l'utilisation combinée de la production d'embryons, de la superovulation, du transfert d'embryon (TE) et de la ponction d'ovocytes associée au développement embryonnaire *in vitro*. Après 40 ans de développement, un des défis majeurs des biotechnologies de la reproduction est la réalisation d'un diagnostic pré-implantatoire, à partir d'un petit nombre de cellules prélevées chez l'embryon, qui ouvre de nouvelles perspectives. Depuis l'ouverture du service de génotypage aux éleveurs bovins laitiers français en 2011, la sélection génomique s'installe à grand pas au sein des élevages des races Montbéliarde, Prim'Holstein, Pie Rouge, Normande et Brune. Grâce au génotypage des femelles, de nouvelles perspectives s'ouvrent au biotechnologies de l'embryon, permettant de prédire le potentiel des donneuses, d'adapter les protocoles de traitement et d'anticiper les plans d'accouplement (choix du mode de reproduction et/ou utilisation de semence sexée). Ces techniques de reproduction servent les pratiques d'élevage et de sélection durables, au niveau collectif autant qu'individuel et devraient encore évoluer avec l'amélioration continue des outils de génotypage et des phénotypes de reproduction.

1974-2014: Does the embryo fit in the era of genomics in Ruminants?

PONSART C. (1, 2), GAMARRA G (2, 3), LACAZE S. (3), MERMILLOD P. (4), LE BOURHIS D. (2), GRIMARD B. (5, 6)

(1) ANSES, Laboratoire de Santé Animale, 23 ave du Général de Gaulle, 94706 MAISONS-ALFORT

(2) UNCEIA, 149 rue de Bercy, 75595 PARIS cedex 12

(3) MIDATEST, Domaine de Sensacq, 64230 DENGUIN

(4) INRA, Centre de recherche Val de Loire, Physiologie de la reproduction, 37380 NOUZILLY

(5) ENVA, Université Paris Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, 7 av du général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex;

(6) INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex;

SUMMARY

Over the last ten years, international trade in embryos has doubled. Embryo transfer remains one of the safest ways to exchange genetic material. Optimizing reproductive technologies has become a strategic priority in the era of genomics : the increase of genetic gain may be accelerated through a combined use of *in vivo* embryo recovery, superovulation, embryo transfer (ET) together with oocyte puncture followed by *in vitro* embryo development. After 40 years of development, one of the major challenges for reproductive biotechnologies is the possibility of a pre-implantation diagnosis from a small number of cells in the embryo, which opens new perspectives. Since the opening of genotyping service to French breeders in dairy cattle in 2011, genomic selection is now largely used in the Montbeliarde, Holstein, Pie Rouge, Normande, and Brown Swiss breeds. Through the genotyping of females, new perspectives are open to embryo biotechnologies, like prediction of the potential response of donor cows, adaptation of treatment protocols and optimization of breeding strategies (choice of mode of reproduction and / or use of sexed semen). These techniques integrate the concept of sustainable breeding practices, both at collective and individual levels and should continue to evolve with the continuous improvement of genotyping tools and reproductive phenotypes.

INTRODUCTION

L'IETS (International Embryo Transfer Society) a été fondée en 1974, avec 82 membres, représentant des scientifiques, des enseignants et des vétérinaires praticiens (Malpletoft, 2013). Cette association est devenue un lieu d'échanges et de discussion dans le domaine du transfert embryonnaire (TE) et des biotechnologies. En particulier, le comité HASAC (Health and Safety Advisory Committee) a été très actif dans la collecte et la diffusion d'informations relatives au contrôle de la

transmission des maladies via le manuel de l'IETS, référentiel des protocoles sanitaires utilisés pour les échanges internationaux d'embryons (Stringfellow and Givens, 2009). Considéré initialement comme une technique d'appoint des schémas de sélection, le TE s'est progressivement imposé par rapport à l'IA classique pour la procréation des mâles d'IA, au moins dans tous les pays et pour les races pour lesquels des programmes de sélection importants sont conduits. En effet, en France, plus de 80% des taureaux d'insémination sont issus de transfert embryonnaire (Tissier et al., 2004). En outre, une revue récente a estimé qu'environ 50 millions de doses de

semence d'une valeur de 250 millions de dollars, et 80 000 embryons bovins d'une valeur de 15 millions de dollars étaient échangés au niveau international chaque année (Thibier and Wrathall, 2012).

Après 40 ans de développement, le TE reste la biotechnologie de l'embryon la plus utilisée dans les schémas de sélection français. Néanmoins, le développement de la sélection génomique chez les bovins a bouleversé grandement le travail des entreprises de sélection (ES) ainsi que l'organisation de l'ensemble du secteur de l'insémination. Les ES évaluent désormais les reproducteurs dès les premières semaines de leur vie, voire à l'état embryonnaire. En effet, toutes les ES françaises ont aujourd'hui abandonné la sélection classique par testage sur descendance pour les races Prim'Holstein, Normande et Montbéliarde (Boichard et al., 2010 ; Pryce & Daetwyler, 2012). Il suffit aujourd'hui d'un génotypage et de quelques semaines pour décider ou non de faire d'un mâle un futur reproducteur pour sa race (CD à la naissance : 0,60 pour le lait) ou d'utiliser une donneuse d'embryons comme mère à taureau. D'une part, l'évaluation génétique offre la possibilité de travailler sur de nouveaux caractères peu héréditaires, fonctionnels liés à la santé, au bien-être animal. D'autre part le génotypage des femelles, possible dès la naissance, permet aux éleveurs de trier précocement les futures reproductrices du troupeau, d'adapter leur stratégie de reproduction à leurs objectifs prioritaires de production : production laitière, amélioration des caractères fonctionnels ou encore vente de génétique (McHugh et al., 2011 ; Clay, 2012 ; Pryce et al., 2012).

Cependant, la marge de progrès reste importante pour les techniques de production *in vitro* et leurs avantages potentiels pour la conduite des schémas de sélection sont importants surtout lorsque l'on considère la possibilité de les intégrer avec la sélection génomique, les nouvelles technologies issues de la génomique fonctionnelle (comme la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique) ou encore le tri de la semence (Humbot et al., 2010, Ponsart et al., 2014). Depuis les années 1990, les équipes de TE ont combiné la micromanipulation des embryons avec une technique PCR (Polymerase chain reaction) pour déterminer le sexe des embryons et transférer les embryons de sexe choisi (Bondioli, 1992; Lopes et al., 2001). Avec l'avènement de la sélection assistée par marqueurs, les avantages potentiels du typage de l'embryon ont été testés sur quelques caractères (Peippo et al., 2007). Dans ce contexte, optimiser l'utilisation des biotechnologies de la reproduction, de l'insémination à la production d'embryons *in vitro*, représente un défi supplémentaire pour accélérer le progrès génétique et augmenter les chances de procréer des candidats intéressants.

1. LES EVOLUTIONS MAJEURES OBSERVEES ENTRE 1974 ET 2014

1.1 DU TRANSFERT CHIRURGICAL AU TRANSFERT DIRECT

Le premier veau issu de TE a été rapporté par E.L. Willet et al. (1951) à l'université du Wisconsin. Malgré ce premier succès, le transfert des embryons représentait encore un problème technique important dans les années 1970. Le transfert d'embryon a d'abord été mis au point par transposition des méthodes chirurgicales proposées par la recherche vétérinaire (Rowson et al., 1969) et cette méthode a été utilisée en station puis en ferme jusqu'en 1980-1981. Du fait des contraintes de cette technique, des travaux ont été menés dès 1975 à l'INRA afin de mettre au point une méthode entièrement non chirurgicale. Cette technique dite cervicale, consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus par voie vaginale (Renard et al., 1977) a été à l'origine du réel développement du TE. Les taux de gestation ont connu une augmentation

spectaculaire dès les premières années d'utilisation (pour revue, Ponsart et al., 2004).

Dès 1981, des taux de gestation de l'ordre de 50% ont en effet été obtenus en ferme, seulement inférieurs de 10 % à ceux obtenus par transfert chirurgical (Heyman, 1982 ; Nibart, 1982).

A cette période de nouveaux protocoles ont été développés et appliqués pour la congélation des embryons produits *in vivo* (Renard 1982) suivis par la mise au point de techniques de sexage et leur mise en œuvre en ferme (Thibier et Nibart 1995). Les premiers essais de transfert d'embryons après congélation par les méthodes classiques (congélation lente, utilisation du glycérol ou du DMSO comme cryoprotecteur, dilution en plusieurs étapes) réalisés avant 1980 ont permis d'obtenir dans un premier temps à partir de séries limitées des taux de gestation généralement de l'ordre de 30 à 40% (Ponsart et al., 2004). La dilution du cryoprotecteur en une seule étape dans une solution de sucrose au moment des opérations de décongélation (Renard 1982) a représenté au début des années 1980 un apport décisif permettant en outre le conditionnement des embryons congelés en paillettes et une mise en place par voie cervicale s'apparentant à celle de l'insémination artificielle. Pour la première fois, des taux de développement après mise en culture des embryons après congélation / décongélation de l'ordre de 80% et des taux de gestation supérieurs à 50% ont été obtenus après transfert.

Au cours des années 1990 à 2000, les modifications ont principalement porté sur la mise au point d'une technique de décongélation permettant de transférer les embryons directement sans avoir à les visualiser ni à les manipuler. Cette méthode dite de "transfert direct" utilise une procédure très simple de congélation / décongélation basée soit sur l'utilisation de l'éthylène glycol (Voelkel et Hu, 1992) ou la combinaison Glycérol - saccharose (Touati et al., 1990). L'efficacité du transfert direct étant identique à celle de la méthode classique, cette technique a très rapidement été utilisée sur le terrain et suivant les séries les taux de gestation rapportés varient de 40 à 70 % (pour revue, Ponsart et al., 2004). En France, elle a nettement influencé l'organisation des transferts, en augmentant nettement la proportion de transferts réalisés "au coup par coup" sur chaleur naturelle, ce qui donne plus de souplesse à l'éleveur.

Enfin, au cours des 10 dernières années, plusieurs modifications ont été apportées aux milieux de congélation pour la conservation des embryons manipulés. La méthode de congélation combinant éthylène glycol et sucrose semble apporter les meilleurs résultats (voir 2.4).

1.2. DE LA COLLECTE DES EMBRYONS IN VIVO A LA PONCTION DES OVOCYTES PAR OPU (OVUM PICK UP)

L'OPU (Ovum Pick Up) est une technique qui permet de ponctionner des follicules intra-ovariens. Elle a été adaptée chez les bovins par Pieterse et al. (1988,1991) à partir de la méthode utilisée depuis de nombreuses années chez la femme. Cette méthode permet de collecter de façon répétée sur l'animal debout, à l'aide d'une aiguille introduite par le vagin les ovocytes intra-ovariens immatures par ponction des follicules visualisés sur l'écran d'un échographe. Les ovocytes ainsi obtenus entrent ensuite dans le cycle maturation – fécondation - culture *in vitro* jusqu'à l'obtention d'embryons viables (morulae ou blastocystes).

Depuis les premiers essais de fécondation *in vitro* dans l'espèce bovine (Goto et al., 1988, Aoyagi et al., 1989, Marquant Leguienne et al., 1989, Voelkel et Hu, 1992), les techniques de culture des embryons *in vitro* ont considérablement évolué. Les premiers systèmes étaient basés sur la co-culture des embryons avec des cellules d'oviducte ou de cumulus (Ponsart et al., 2004). Pour des raisons sanitaires mais aussi pour faciliter la mise en œuvre

de la technique, ces systèmes ont évolué vers la co-culture avec des cellules issues de lignées particulières ; cellules BRL ou cellules Vero (Menck et al., 1997, Marquant Leguienne et al., 2001). Enfin des méthodes de culture dans des milieux "chimiquement définis", en l'absence de cellules (avec ou sans sérum ajouté) ont été développées. Dans de tels milieux, tels que le SOF (Synthetic Oviductal Fluid ; Holm et al., 1999), il est alors possible de cultiver les embryons bovins avec succès sans support cellulaire même en l'absence de protéines d'origine animale telles que le sérum de veau fœtal (George et al., 2008).

L'OPU initialement développée en station a été ensuite mise en œuvre en ferme par de nombreuses équipes selon des modalités différentes (Galli et al., 2003, Merton et al., 2003). Les collectes d'ovocytes par OPU peuvent être réalisées régulièrement deux fois par semaine sans superovulation. Après stimulation ovarienne par FSH, le rythme de collecte passe à une fois par semaine ou une fois toutes les deux semaines le plus souvent (Tableau 1 ; Knijn et al., 2012 ; Viera et al., 2014). Dans ce cas, les doses de FSH utilisées sont généralement inférieures à celles employées dans les protocoles de production d'embryons *in vivo*. Récemment, des traitements incluant une période de « *coasting* », délai compris entre 44 et 68 h entre la dernière injection de FSH et l'OPU, ont permis d'améliorer les taux de développement, avec des valeurs supérieures à 50 % (Nivet et al., 2012).

L'utilisation commerciale de cette technique a augmenté de façon très importante depuis les années 2001, avec plus de 300 000 embryons produits par OPU-FIV au Brésil, contre seulement quelques centaines en France (Thibier, 2014). Des données récentes rapportent des nombres moyens d'ovocytes collectés variant de 6 à 16 et des nombres d'embryons produits *in vitro* compris entre 1,0 et 3,5 chez les donneuses de race Holstein (Guyader-Joly et al., 2010 ; Pontes et al., 2010 ; Nivet et al., 2012 ; Merton et al., 2013 ; Viera et al., 2014). Chez le zébu de race Nelore, les valeurs sont beaucoup plus élevées, avec 30 ovocytes collectés et 8 embryons produits (Pontes et al., 2011). Quatre cycles d'OPU-FIV avec des donneuses stimulées peuvent être répétés dans le même intervalle de temps qu'une collecte. Par conséquent, les producteurs laitiers peuvent espérer avec l'utilisation de semence conventionnelle (non sexée) obtenir 2 à 4 fois plus d'embryons pour une durée de 60 jours par OPU-FIV par rapport à la collecte d'embryons *in vivo*.

Tableau 1 : Collecte d'ovocytes dans un cadre commercial dans les principaux pays européens utilisant l'ovum pick up (OPU ; d'après Knijn et al., 2012)

Pays	Super-ovulation	Fréquence des OPU	Age minimal des génisses
Allemagne	Oui	1 fois/s ou tous les 15 j ¹	8-9 mois (après 1ères chaleurs)
France	Oui	1 fois/ s	10-15 mois
Italie	non	2 fs/s ou 1 fs/s (ferme)	6-7 mois
Pays-bas	Oui	2 fs/s ou 1 fs/s (ferme)	12 mois

¹ s=semaine, j=jours

1.3. DE LA CONGELATION LENTE A LA VITRIFICATION

Les années 1990-2000 ont également été marquées par la mise au point de la vitrification, méthode de cryopréservation extrêmement simple, visant à obtenir un embryon à l'état "vitreux", par élévation extrême de sa viscosité au cours d'un refroidissement très rapide (Massip et al., 1987). Des résultats encourageants ont été obtenus dans les années 1990 (44,5% de gestation (n=393), Van Wagendonk et al., 1994). La mise au point des paillettes OPS (Open Pull Straw; Vajta et al., 1998, 2000) et de nombreux systèmes (CRYOTOP, CRYOLOOP, VITTRANS) combinée à l'utilisation d'appareils permettant des descentes hyperrapides de température ont

amélioré la méthode (Mukaida et al., 2003 ; Kuwayama et al., 2007 ; Mogas et al., 2014). Toutefois, les résultats ne sont pas vraiment supérieurs à ceux obtenus après utilisation des méthodes dites de congélation équilibrée et les résultats obtenus après transfert sont peu nombreux (Mogas, 2014). En effet, il est plus difficile d'appliquer cette méthode de façon tout à fait répétable en ferme, du fait du manque de "souplesse" des protocoles, dû à la toxicité des cryoprotecteurs utilisés à fortes concentrations et à l'enchaînement d'étapes d'équilibration extrêmement courtes et précises. Les méthodes de congélation classiques associées au transfert direct des embryons restent donc aujourd'hui les plus largement utilisées.

2. EMBRYON ET SELECTION GENOMIQUE

2.1. UTILISATION DES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION CHEZ DES FEMELLES GENOTYPEES DANS LE CADRE DE LA SELECTION

Depuis les années 1980, l'utilisation des biotechnologies de l'embryon a largement contribué à améliorer l'efficacité des schémas de sélection jugée au travers du progrès génétique annuel, en réduisant l'intervalle de génération via la voie femelle, tout en permettant d'intensifier la sélection des animaux candidats (Boichard et al., 2010, Humblot et al., 2010, Ponsart et al., 2014). Avec la sélection génomique, le potentiel génétique des reproducteurs est connu beaucoup plus rapidement. Le génotypage de nombreux candidats dans les schémas permet d'augmenter la pression de sélection. Dans ce contexte, l'utilisation de biotechnologies permettant de générer un grand nombre de candidats à évaluer dans une période donnée est une stratégie qui peut accélérer le progrès génétique pour les caractères sélectionnés : De Roos (2014) a estimé que l'augmentation de la précision des index génomiques de 7 % (soit un CD passant de 60 à 67 %) pouvait être atteinte de façon équivalente i) en collectant les gamètes 3 mois plus tôt (semence et ovocytes), ii) en raccourcissant l'intervalle de 1,5 mois entre la production des embryons et leur transfert, iii) en augmentant le nombre d'embryons produits par donneuse de 35 % ou iv) en améliorant les taux de gestation après transfert de 50 à 68 %. L'autre stratégie consiste à utiliser le génotypage des femelles, à large échelle, afin de constituer une population de référence dans laquelle la relation entre génotype et phénotypes pourra être étudiée (Pryce et al., 2012).

En outre, l'utilisation combinée de la sélection génomique, de la semence sexée et des biotechnologies de l'embryon chez les bovins laitiers dans les programmes de sélection a récemment été évaluée par des études de simulation : l'utilisation de la semence sexée renforcerait le gain génétique annuel, surtout si la semence sexée est utilisée pour l'ensemble de la population en production (Sørensen et al., 2011 ; Pedersen et al., 2012). Cependant, l'effet semble être limité par rapport aux biotechnologies de l'embryon. Si la mise en place de la semence sexée agit principalement par l'augmentation du nombre de candidats femelles (gains pour l'éleveur en terme de renouvellement du troupeau et pour les schémas de sélection via une pression de sélection supérieure pour les mères à taureaux), les biotechnologies de l'embryon conduisent à intensifier l'utilisation d'un nombre réduit de femelles d'élite sélectionnées (Pedersen et al., 2012).

Cette stratégie, si elle n'est pas utilisée de façon raisonnée, pourrait augmenter de manière significative le taux de consanguinité, principalement en raison de collectes répétées d'ovocytes ou d'embryons, et de la réduction concomitante du nombre de femelles sélectionnées (Colleau et al., 2009). En effet, le raccourcissement de l'intervalle de génération associé à une augmentation de la pression de sélection peut tendre à accroître fortement le taux de consanguinité d'où l'intérêt de schémas permettant de contrôler une telle augmentation

(Pedersen et al., 2012). De ce point de vue l'OPU-FIV offre plus de souplesse dans la gestion des accouplements que la production d'embryons *in vivo* (Humblot et al., 2010). L'utilisation du génotypage femelle donne la possibilité de contrôler la consanguinité par l'utilisation de plans d'accouplement où les liens entre les animaux sont quantifiés au niveau génomique. Ces outils peuvent aussi être valorisés dans le cas d'accouplements impliquant des animaux porteurs de d'anomalies génétiques (Clay, 2012 ; Pryce et al., 2012).

2.2. VERS DE NOUVEAUX CARACTERES PERMETTANT DE CIBLER LES FEMELLES CANDIDATES A L'UTILISATION DES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION

Au niveau de la population, l'efficacité de la fonction de reproduction reste un point critique de l'utilisation des techniques de reproduction assistées. Beaucoup de progrès peuvent être réalisés pour optimiser les biotechnologies de l'embryon, en utilisant l'effet puissant de la sélection génomique comme levier. On peut alors espérer sélectionner les vaches donneuses pour obtenir de meilleures réponses, par l'amélioration globale des caractères de fertilité, ou plus spécifiquement pour une meilleure aptitude à la production d'embryons ou à la cryopréservation des gamètes.

Des études récentes ont démontré que les embryons issus de parents de deux races différentes se développent plus rapidement et avec des taux de développement plus élevés que les embryons de race pure (Lazzari et al., 2011; Boediono et al., 2003). Avec l'émergence de plans d'accouplement génomiques, le choix « génétique » des accouplements proposés aux vaches donneuses pourrait contribuer significativement à l'amélioration des résultats de production d'embryons.

Depuis l'introduction de la production d'embryons *in vitro*, de nombreux efforts ont été entrepris pour améliorer l'efficacité des systèmes de culture. La sélection génomique offre de nouveaux outils pour permettre la sélection de donneuses présentant des ovocytes mieux adaptés à cette phase de maturation, puis de culture *in vitro*. L'héritabilité des caractères qualitatifs (qualité des ovocytes, taux de segmentation et de développement) semble être plus faible que celle des caractères quantitatifs (nombre total d'ovocytes, nombre d'embryons ; Merton et al., 2009). Cependant, cette voie peut être prometteuse car pour l'ensemble de ces variables, les coefficients d'héritabilité (de l'ordre de 0,15 - 0,2) sont bien supérieurs à ceux rapportés antérieurement pour la fertilité après IA (Merton et al., 2009.).

Différentes composantes de l'efficacité des biotechnologies de la reproduction ont déjà été associées à des polymorphismes nucléotidiques ou single nucleotide polymorphisms (SNP) chez les bovins. Ces marqueurs pourraient être ajoutés comme nouvelles caractéristiques pour améliorer la fertilité ainsi que l'efficacité de production d'embryons chez les donneuses. En particulier, des listes de SNP associés au nombre d'ovocytes viables, aux taux de fécondation, segmentation et développement ont récemment été rapportés par plusieurs auteurs. Les effets maximaux observés entre les génotypes ont varié de 5,4 à 12,2 % pour les taux de fécondation (Khatib et al., 2009) et de 3,9 à 23,2 % pour le développement de l'embryon à partir de l'étape de segmentation (Cochran et al., 2013), démontrant ainsi l'intérêt potentiel la sélection génomique appliquée aux biotechnologies de l'embryon. Avec la puce LD (Illumina, San Diego), une liste personnalisée de SNP pourrait être conçue afin de maximiser l'efficacité de la biotechnologie et de sélectionner les donneuses avec un potentiel maximal de production d'embryons. Un autre point critique peut être lié à la corrélation génétique négative entre les caractères de reproduction et d'autres caractères, spécialement la production laitière, comme suggéré par Pimentel et al. (2011).

Enfin, il a été montré que les ovocytes, les embryons, les lymphocytes, et les cellules de l'oviducte et de l'endomètre ont une plus grande tolérance à la chaleur pour les génotypes Bos indicus que pour Bos taurus (Paula Lopes et al., 2013). Cette variation génétique se traduit par une plus grande capacité de thermorégulation et de thermorésistance cellulaire dans ces races. En général, le stress thermique restreint la compétence de développement ovocytaire car il induit des phénomènes d'apoptose, endommage le cytosquelette des ovocytes, et altère la fonction mitochondriale. Les effets délétères du stress thermique sur l'efficacité des biotechnologies de la reproduction pourraient donc être modulés par des outils de génomique personnalisés : des résultats prometteurs chez les zébus permettent d'envisager à terme pour cette espèce une liste dédiée de SNP (Paula Lopes et al., 2013).

2.3. VERS L'UTILISATION DE MARQUEURS PREDICTIFS ISSUS DE LA GENOMIQUE FONCTIONNELLE

L'éventail des mesures de génomique fonctionnelles disponibles pour explorer le développement embryonnaire s'est élargi grâce aux nouvelles biotechnologies de la reproduction, comme l'OPU-FIV, la collecte d'embryons dans l'oviducte par endoscopie (Carter et al., 2010), le génotypage de l'embryon (Humblot et al., 2010, Ponsart et al., 2014) ainsi que l'utilisation de cultures de cellules de l'oviducte (Cordova et al., 2013) et de l'endomètre (Mansouri-Attia et al., 2009). De nombreuses études de transcriptomique dédiées au développement de l'embryon ont identifié des ensembles de gènes liés à plusieurs périodes clés du développement : avant l'activation du génome embryonnaire (AGE), entre l'éclosion du blastocyste et son élongation ultérieure (8^{ème} au 17^{ème} jour de développement (pour revue voir Hue et al., 2007), suivie du début de l'implantation (7, 10, 13, 16 et 19^{ème} jour de développement ; Mamo et al., 2011). Ces études décrivent des profils d'expression génique formant des séquences dynamique de transcription au cours de ces stades de développement.

De nombreuses études ont été élaborées pour évaluer les mécanismes régissant le début de l'AGE (pour revue Graf et al., 2014a). Bien que la régulation de l'AGE soit considérée comme des mécanismes largement conservés chez les mammifères, les protéines OCT4, SOX2 et NANOG n'ont pas été détectées avant l'AGE chez les bovins laissant à penser qu'ils ne sont pas impliqués dans cette étape contrairement aux observations chez la souris (Khan et al., 2012).

Plusieurs auteurs ont proposé des sets de gènes permettant d'estimer la qualité de l'embryon à différents stade. Récemment, le séquençage de l'ARN a été réalisé pour différents stades (ovocyte en métaphase II, embryon de 4, 8, 16 cellules, blastocyste), constituant un ensemble complet de données du transcriptome bovin au cours du développement précoce (Graf et al., 2014b). Lazzari et al. (2011) ont sélectionné un panel de gènes liés à la compétence de développement et ont évalué la qualité embryonnaire via l'expression de ces gènes dans l'embryon au 7^{ème} jour de développement : MNSOD, SLC2A5, IGF1R, IFNT, G6PDH, BAX, GJA1 (Gutierrez-Adan et al. 2004), GP130 (Eckert & Niemann 1998), FGF4 (Daniels et al. 2000) and PED (Fair et al., 2004). Pour le 12^{ème} jour de développement, des gènes spécifiques du trophoblaste ou marqueurs d'apoptose ont été proposés : IFNT and BAX (Gutierrez-Adan et al. 2004), PTGS2, PLAC8, MSX1 (El-Sayed et al. 2006) and CDX2 (Degrelle et al. 2005).

L'objectif reste de mieux caractériser le développement de l'embryon *in vivo*, en tenant compte des composantes de l'environnement maternel pouvant impacter la qualité intrinsèque de l'embryon (Forde et al., 2013). Au niveau de l'endomètre, aucune différence n'a été observée entre des femelles cyclées et gestantes, alors que les gènes associés à la réponse immunitaire et à l'adhésion cellulaire sont exprimés après le 16^{ème} jour de développement. Un certain nombre de

gènes ont été identifiés à partir d'une analyse du transcriptome de tissus extra-embryonnaires (Degrelle et al., 2011). Cette étude a permis une meilleure compréhension de la cinétique d'expression de transcription dans les tissus extra-embryonnaires impliqués dans le processus de la gastrulation et pourra servir à identifier des marqueurs prédictifs de fertilité. Cette identification est compliquée par l'aspect dynamique des différentes régulations et les différences d'expression temporelles. Néanmoins, la correspondance de ces gènes avec des SNP et la réalisation d'approches de séquençage devraient faciliter l'identification de gènes ou un ensemble de gènes critiques pour le développement embryonnaire.

2.4. DIAGNOSTIC PRE-IMPLANTATOIRE A PARTIR DE CELLULES EMBRYONNAIRES

L'une des principales contraintes vécues par les éleveurs et les entreprises de sélection en Europe reste la disponibilité limitée des femelles receveuses. Depuis 20 ans, les ES ont à leur disposition la méthode de sexage des embryons permettant de limiter le nombre de transferts en ferme. Des cellules embryonnaires sont prélevées par biopsie. L'ADN est ensuite amplifié par PCR (Bondioli et al., 1992 ; Lopes et al., 2001) permettant de révéler une séquence spécifique du chromosome Y chez l'embryon mâle. Le compromis à atteindre consiste à préserver la viabilité de l'embryon tout en obtenant une quantité d'ADN suffisante pour cette analyse. Pour y parvenir, l'objectif est de prélever 5 à 10 cellules par embryon lors d'une biopsie (Thibier et Nibart 1995 ; Ponsart et al., 2014).

Récemment, la détection de marqueurs génétiques a été réalisée à partir de biopsies embryonnaires au stade blastocyste. Cela ouvre la voie pour développer de nouvelles stratégies basées sur le diagnostic pré-implantatoire, applicable dès la première semaine de développement, dans le cadre d'opérations de collectes d'embryons. Les avantages du génotypage de l'embryon ont été rapportés dès que la sélection assistée par marqueurs (SAM), basée sur un nombre limité de marqueurs micro satellites a été utilisée, en raison de l'estimation simultanée de plusieurs caractères dès un stade précoce de développement (Peippo et al., 2007). Les avantages vis-à-vis du progrès génétique potentiel sont encore plus importants avec l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs SNP (Humblot et al., 2010). Cependant, un des défis majeurs de la sélection génomique au stade embryonnaire est la détection d'un très grand nombre de SNP à partir d'un petit échantillon d'ADN prélevé chez un embryon pré-implantatoire. Plusieurs stratégies ont été testées pour amplifier la quantité d'ADN disponible et ainsi estimer le potentiel génétique des embryons (Humblot et al., 2010, Ponsart et al., 2014).

L'amplification du génome complet (whole genome amplification ou WGA) a été développée pour la pré-amplification de petites quantités d'ADN génomique, permettant même d'utiliser une cellule unique (Lovmar et al., 2006 ; Dean et al., 2002). Depuis, cette méthode a été largement utilisée dans une variété d'applications (Paez et al., 2004 ; Gunderson et al., 2005 ; Lovmar et al., 2006), incluant le génotypage à haut-débit par puce Affymetrix ou Illumina pour l'espèce bovine (Guillaume et al., 2009). Des kits commerciaux d'amplification selon la méthode WGA sont disponibles et présentent une bonne fiabilité et exactitude (Treff et al., 2001). De plus, l'ADN génomique pré-amplifié à partir de cellules embryonnaires issues de diverses espèces (porcin, caprin, bovin et humain) a été utilisé dans de nombreuses études. Le but est de développer des tests de diagnostic génétique pré-implantatoire qui incluent des caractères spécifiques comme le sexe, la sensibilité vis-à-vis du prion chez des embryons caprins ou des anomalies génétiques, comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) chez l'humain (Ren et al., 2009 ; Polisseni et al., 2010 ; Akasaka et al., 2011 ; Guignot et al., 2011).

Différentes expériences ont été conçues pour affiner les conditions assurant une quantité suffisante d'ADN génomique après pré-amplification (Ponsart et al. 2014). Après amplification WGA, les échantillons de 5 à 10 cellules ont présenté des taux de détection de marqueurs (proportion de marqueurs détectés ou call rate, CR) significativement plus élevés que les échantillons comportant moins de 5 cellules (98 % contre 75 % ; Le Bourhis et al.,

2009). Après WGA, une quantité d'ADN allant de 5 à 7 µg (analyse PicoGreen) est générée, ce qui représente une augmentation d'au moins 40 000 fois la quantité initiale d'ADNg. Toutefois, le taux d'amplification du génome n'est pas nécessairement proportionnel à la quantité d'ADN de départ. L'amplification déséquilibrée de locus hétérozygotes peut entraîner des phénomènes de perte allélique (allele drop-out ; ADO ; cas d'un allèle hétérozygote, détecté homozygote à tort à partir des cellules de la biopsie), avec des valeurs d'ADO comprises entre 2 et 18 % (Lebourhis et al., 2009 ; Humblot et al., 2010 ; Le Bourhis et al., 2011 ; Fisher et al., 2012 ; Sargolzaei et al., 2012 ; Lauri et al., 2013). D'autres erreurs semblent être le résultat d'un phénomène inverse (détection d'allèles hétérozygotes à tort), (Fisher et al., 2012). Plusieurs auteurs ont montré que le CR observé après pré-amplification par WGA augmente de façon significative avec le nombre de cellules (Ling et al., 2009 ; Tableau 2).

Tableau 2 : Taux moyens de détection des marqueurs ou « call rates » (CR) après pré-amplification de biopsies embryonnaires par la technique WGA et génotypage avec une puce Illumina selon le nombre de cellules (d'après Ponsart et al. 2014)

Référence	Nombre de cellules	Nombre de biopsies	CR (moyenne± erreur type)
Le Bourhis et al., 2011	5 à 7	12	85 ± 8 ^a
	8 à 10	14	90 ± 4 ^b
Fisher et al., 2012	1	17	77.6 ± 6.2
	3	18	85.5 ± 2.8
	>1/2 morula	6	96.3 ± 1.7

Une corrélation négative entre les CR et les erreurs d'amplification a été rapportée (Fisher et al., 2012). Les CR moyens à partir d'ADN embryonnaire pré-amplifié varient de 78 à 90 % (Tableau 2) et restent donc inférieurs à ceux obtenus à partir de prélèvements sanguins chez les animaux vivants. Cependant, lorsque l'on compare les marqueurs hétérozygotes (SNP) de l'embryon à ceux du veau qu'il a ensuite engendré, il a été observé que les CR supérieurs à 85 % correspondent à un taux inférieur à 1 % de ADO (Le Bourhis et al., 2012). En conséquence, seules les biopsies présentant des CR supérieurs à 85 % sont utilisées pour estimer les index génomiques des embryons, ce qui est le cas pour 85 à 91 % des échantillons (Le Bourhis et al., 2012).

Les embryons biopsiés sont cultivés in vitro pendant 24 à 48 heures ou immédiatement transférés frais ou congelés chez des receveuses synchronisées (El Sayed et al., 2006 ; Lacaze et al., 2009 ; Ghanem et al., 2011). Les taux de gestation varient de 47,3 à 62,3 % après transfert direct d'embryons biopsiés congelés, selon le stade de développement embryonnaire ou la méthode de biopsie (Tableau 3). Lorsque les embryons sont transférés à l'état frais, les taux de gestation ont tendance à être corrélés à leur qualité et au stade embryonnaire. La congélation des embryons produits in vitro et biopsiés reste un challenge technique pour utiliser le génotypage combiné à la production d'embryons in vitro.

Les taux de survie après décongélation des blastocystes congelés lentement à -25 °C dans le glycérol seul (53,8 %) sont plus bas que ceux des blastocystes congelés à -25 °C ou

-30 °C dans ce milieu additionné de sucrose (91,3 % ; Tominaga et al., 2007). Les effets positifs du sucrose sont également rapportés chez les embryons collectés *in vivo* puis biopsiés (taux de gestation atteignant 55,8 % dans le milieu contenant le sucrose, versus 40,8 % pour les embryons contrôles; Lacaze et al. (2009).

En combinant les technologies de reproduction et les outils de sélection génomique, les éleveurs pourront très prochainement disposer d'outils puissants leur permettant d'optimiser l'efficacité reproductive de leur troupeau. L'utilisation au quotidien des index génomiques estimés pour les caractères d'intérêt particulier et / ou la présence d'anomalies génétiques pour la reproduction s'ajoutent à la palette des biotechnologies dédiées à la gestion de la reproduction et aux schémas de sélection. En outre, le diagnostic génétique préimplantatoire combiné avec la congélation et le transfert des embryons ouvre de nouvelles perspectives pour faciliter la mise en œuvre et augmenter l'efficacité des schémas de sélection. Ceci permet la détection de caractères et mutations spécifiques à un stade précoce et de diminuer le nombre de transferts en ciblant les embryons candidats à transférer

Tableau 3 Taux de gestation après transfert d'embryons bovins biopsés et congelés, en ferme ou en station (EG = éthylène glycol ; SVF = Sérum de veau fœtal ; TD = transfert direct ; AI = aiguille ; AS = aspiration ; MC = microcouteau ; P = pipette de maintien ; Q=qualité ; d'après Ponsart et al., 2014)

Auteurs	Embryon	Biop-sie	Cryo-conservation	Taux de gestation
Gonzales et al., 2008	56 <i>in vivo</i> , Q1=24 ; Q2=7 ; Q3=23 ; station	MC+ P	congélation dans 1,5 M d'EG, TD	à 90 j : Q1 54% Q2 57% Q3 48%
Lacaze et al., 2009	671 <i>in vivo</i> , Q1, ferme	MC +P	État frais (284)	59 %
			1.5 M EG + 40 % SVF (53) ou 0,1 M sucrose (340)	50 %
Fisher et al., 2012	42 blastocystes <i>in vitro</i> vitrifiés (versus 42, état frais)	MC	Vitrification (Cryologic) ; incubation de 2h et évaluation avant TE	À jour 65 : 43 % (état frais : 38 %)
Cenariu et al., 2013	407 <i>in vivo</i>	AI	Biopsie, puis 3 h de culture TCM199 +	À jour 30 : 57 %
		AS	20 % SVF ;	43 %
		MC	congélation dans EG	31 %
CRV ¹	231 <i>in vivo</i>	MC	EG, période de 4 mois	44% (vs 52% entiers)

¹ communication personnelle

CONCLUSION

La sélection génomique permet aux éleveurs laitiers de s'engager plus encore vers un pilotage durable de leur troupeau : d'une part, l'évaluation génétique offre la possibilité de travailler sur de nouveaux caractères peu héréditaires, fonctionnels liés à la santé, au bien-être animal ; d'autre part le génotypage des femelles, possible dès la naissance, leur permet de trier précocement les futures reproductrices du troupeau, d'adapter leur stratégie de reproduction à leurs objectifs prioritaires de production : production laitière, amélioration des caractères fonctionnels ou encore vente de

génétique. Grâce à ces outils innovants combinés à l'élaboration de systèmes experts, ils pourront gérer de façon plus sécurisée le renouvellement de leur troupeau, piloter de façon individualisée la mise à la reproduction des femelles, avec une palette de caractères sélectionnés en constante évolution et des plans d'accouplement optimisés. Au niveau des populations, ces outils constituent des leviers puissants sur le progrès génétique, le contrôle de mutations délétères ou de caractères d'intérêt, l'efficacité de la reproduction, la santé et le bien-être, avec une meilleure gestion de la variabilité génétique.

Les auteurs remercient l'Agence Nationale de la Recherche et APISGENE pour le co-financement du projet TYPAGENAE, soutenu dans le cadre de l'appel d'offre GENANIMAL 2003, ainsi que les entreprises de sélection adhérentes à l'UNCEIA ayant financé le programme « Typage de l'embryon bovin » à partir de 2008 et les partenaires ayant contribué au projet :

-chercheurs et techniciens de l'UNCEIA, spécialisés dans les biotechnologies de l'embryon et les chercheurs du service génétique :

-Equipes de transfert embryonnaire des entreprises de sélection adhérentes à l'action thématique de recherche sur l'embryon : Umotest, Midatest, Amélis, Créavia, L'Aigle, Jura Betail, Ualc, Ucatrc, Ucear, Géniatest et Génésia, -Laboratoires de l'INRA : les équipes G2B de l'unité GABI et BDR de Jouy en Josas ainsi que l'équipe PRC de Nouzilly, -Laboratoire de génotypage LABOGENA.

Akasaka E., Ozawa A., Mori H., Mizobe Y., Yoshida M., Miyoshi K., Sato M., 2011. Theriogenology, 75:1543-1549.

Aoyagi Y., Fukui Y., Iwazumi M., Minegishi Y., 1989. Theriogenology, 81,168.

Boediono A., Suzuki T., Godke R.A., 2003. Anim. Reprod. Sci., 78(1-2), 1-11.

Boichard D., Guillaume F., Baur A., Colleau J.J., Croiseau P., Boscher M.Y., Ducrocq V., Fritz S., 2010. Le nouveau praticien vétérinaire, 4(16), 327-334.

Bondioli K.R., 1992. J. Anim. Sci. 70:19-29.

Carter F., Rings F., Mamo S., Holker M., Kuzmany A., Besenfelder U., Havlicek V., Mehta J.P., Tesfaye D., Schellander K., Lonergan P., 2010. Biol. Reprod., 83(5), 707-719.

Cenariu M., Pall E., Cernea C., Groza I., 2012. J Biomed Biotechnol., 541384.

Clay J.S., 2012. In "Proceedings of the 38th ICAR session, Cork". 28 Mai - 01 Juin 2012, www.icar.org.

Cochran S. D., Cole J. B., Null D. J., Hansen P. J., 2013. Biol. Reprod., 89(3):69.

Colleau J.J., Fritz S., Guillaume F., Baur A., Dupassieux D., Boscher M.Y., Journaux L., Eggen A., Boichard D., 2009. Renc.Rech.Ruminants 16, 419

Cordova A., Perreau C., Schmaltz-Panneau B., Locatelli Y., Ponsart C., Mermillod P., 2013. Gynecol Obstet Fertil., 41(9):537-539.

Daniels R., Hall V., Trounson A.O., 2000. Biol. Reprod., 63(4):1034-1040.

Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., and Faruqi, A. F., 2002. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 5261-5266.

De Roos S., 2014. In 30^{ème} colloque scientifique de l'AETE, Dresden, Allemagne. www.aete.eu.

Degrelle S.A., Campion E., Cabau C., Piumi F., Renaud P., Richard C., Renard J.P., Hue I., 2005. Dev. Biol., 288(2):448-60.

Degrelle S.A., Lê Cao K.A., Heyman Y., Everts R.E., Campion E., Richard C., Ducroix-Crépy C., Tian X.C., Lewin H.A., Renard J.P., Robert-Granié C., Hue I., 2011. Reproduction, 141(1), 79-89.

Eckert J., Niemann H., 1998. Mol. Hum. Reprod., 4(10):957-65.

El-Ssayed A., Hoelker M., Rings F., Sahliew D., Jennen D., Tholen E., Sirard M-A., 2006. Physiol Genomics, 28, 84-96

- Fair T., Gutierrez-Adan A., Murphy M., Rizos D., Martin F., Boland M.P., Lonergan P., 2004. *Biol. Reprod.*, 70(2), 488-494.
- Fisher P.J., Hyndman D.L., Bixley M.J., Oback F.C., Popovic L., McGowan L.T., Berg M.C., Wells D.N., 2012. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 72, 156–158.
- Forde N., Mehta J.P., McGettigan P.A., Mamo S., Bazer F.W., Spencer T.E., Lonergan P., 2013. *BMC Genomics*, 14:321.
- Galli C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G., 2003. *Theriogenology*, 59,599-616.
- Ghanem N., Salilew-Wondim D., Gad A., Tesfaye D., Phatsara C., Tholen E., Looft C., Schellander K. and Hoelker, M., 2011. *Reproduction* 142, 551–564.
- George F., Daniaux C., Genicot G., Verhaeghe B., Lambert P., Donnay I., 2008. *Theriogenology*, 69(5):612-623.
- Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Kobam Y., Nakashi Y., Ogawa K., 1988. *J. Reprod. Fert.*, 83,753-758.
- Graf A., Krebs S., Heininen-Brown M., Zakhartchenko V., Blum H., Wolf E., 2014a. *Anim Reprod Sci.*, 149(1-2):46-58.
- Graf A., Krebs S., Zakhartchenko V., Schwalb B., Blum H., Wolf E., 2014b. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 111(11):4139-4444.
- Guignot F., Perreau G., Cavarroc C., Touzé J. L., Pougard J. L., Dupont F., Beckers J. F., Remy B., Babillot J. M., Bed'Hom B., Lamorinière J. M., Mermillod P., Baril G., 2011. *Reprod. Domest. Anim.*, 46(4), 656-663.
- Guillaume F., Fritz S., Croiseau P., Legarra A., Robert-Granié C., Colombani C., Patry C., Boichard D., Ducrocq V., 2009. *Renc. Rech. Rum.*, 16, 399-406
- Gunderson K. L., Steemers F. J., Lee G., Mendoza L. G., and Chee M. S., 2005. *Nat. Genet.* 37, 549–554.
- Gutiérrez-Adán A., Rizos D., Fair T., Moreira P.N., Pintado B., de la Fuente J., Boland M.P., Lonergan P., 2004. *Mol Reprod Dev.*, 68(4), 441-448.
- Guyader-Joly C., Moulin B., Mariller F., Currin V., Ponchon S., Gonzalez C., Humblot P., Ponsart C., 2010. *Reprod. Fertil. Dev.*, 22 (1), 378.
- Heyman Y., 1982. In ITEB Editions, *La transplantation embryonnaire chez les bovins*. Paris, France. 105-111.
- Holm P., Booth P.J., Schmidt M.H., Greve T., Callesen H., 1999. *Theriogenology*, 52(4), 683-700.
- Hue I., Degrelle S.A., Campion E., Renard J.P., 2007. *Soc Reprod Fertil Suppl.*, 64:365-77.
- Humblot P., Le Bourhis D., Fritz S., Colleau J.J., Gonzalez C., Guyader Joly C., Malafosse A., Heyman Y., Amigues Y., Tissier M., Ponsart C. 2010. *Vet. Med. Int.*, 192787.
- Khan D.R., Dubé D., Gall L., Peynot N., Ruffini S., Laffont L., Le Bourhis D., Degrelle S., Jouneau A., Duranthon V., 2012. *PLoS One*, 7(3):e34110.
- Khatib H., Maltecca C., Monson R.L., Schutzkus V., Rutledge J.J., 2009. *BMC Genet.*, 10, 13.
- Knijn H., 2012. A.E.T.E. Newsletter N°38, www.aete.eu.
- Kuwayama M., 2007. *Theriogenology*, 67(1), 73-80.
- Lacaze S., Ponsart C., Humblot P., 2009. In *Proceedings 25ème colloque de l'AETE 2009*:208.
- Lacaze S., Humblot P., Ponsart C., 2008. *Renc. Rech Ruminant*, 287-290.
- Lauri A., Lazzari G., Galli C., Lagutina I., Genzini E., Braga F., Mariani P., Williams J., 2012. *Genomics*, 101(1), 24–29.
- Lazzari G., Colleoni S., Duchi R., Galli A., Houghton F.D., Galli C., 2011. *Reproduction*, 141, 625–632.
- Le Bourhis D., Amigues Y., Charreaux F., Lacaze S., Tissier M., Guyader-Joly C., Mervant G., Moulin B., Vignon X., Gonzalez C., Humblot P., 2009. *Reprod. Fert.Dev.*, 21, 192.
- Le Bourhis D., Mullaart E., Schrooten C., Fritz S., Coppieters W., Ponsart C., 2012. In: 38th Annual Conference of the IETS, Phoenix (Arizona) USA. 7-10 janvier 2012:180 (Abstract 135).
- Le Bourhis D., Mullaart E., Humblot P., Coppieters W., Ponsart C., 2011. In: 37th Annual Conference of the IETS, 6-12 janvier 2011, Orlando (Floride) USA. p. 197 (Abstract 193).
- Ling, J., Zhuang, G., Tazon-Vega, B., Zhang, C., Cao, B., Rozenwaks, Z., and Xu, K., 2009. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 739–747.
- Lopes R.F., Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L., 2001. *Theriogenology*, 56(9),1383-1392.
- Lovmar L., Syvanen A.C., 2006. *Hum. Mutat.*, 27, 603–614
- Mamo S., Carter F., Lonergan P., Leal C.L., Al Naib A., McGettigan P., Mehta J.P., Evans A.C., Fair T., 2011. *BMC Genomics.*, 12:151.
- Mansouri-Attia N., Sandra O., Aubert J., Degrelle S., Everts R.E., Giraud-Delville C., Heyman Y., Galio L., Hue I., Yang X., Tian X.C., Lewin H.A., Renard J.P., 2009. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(14):5687-5692.
- Mapletoft R., 2013. *Anim. Reprod.*, 10 (3), 168-173.
- Marquant-Le Guienne B., Gerard M., Solari A., Thibault C., 1989. *Reprod. Nutr. Dev.*, 29,559-568.
- Marquant-Le Guienne B., Guyader-Joly C., Ponchon S., Dellaleau N., Florin B., Ede P., Ponsart C., Guerin B., Humblot P., 2001. *Theriogenology*, 55,433 (Abstr.).
- Massip A., Van der Zwalmen P., Ectors F., 1987. *Theriogenology*, 27,69-79.
- Mc Hugh N., Meuwissen T.H., Cromie A.R., Sonesson A.K., 2011. *J. Dairy Sci.*, 94(8), 4109-4118.
- Menck M.C., Guyader-Joly C., Peynot N., LeBourhis D., Lobo R.B., Renard J.P., Heyman Y., 1997. *Reprod. Nut. Dev.*, 37,141-150.
- Merton J.S., Ask B., Onkundi D.C., Mullaart E., Colenbrander B., Nielen M., 2009. *Therio.*, 72, 885–893.
- Merton J.S., Knijn H.M., Flapper H., Dotinga F., Roelen B.A., Vos P.L., Mullaart E., 2013. *Theriogenology*, 80(4):365-371.
- Merton J.S., de Roos A.P., Mullaart E., De Ruigh L., Kaal L., Vos P.L., Dieleman S.J., 2003. *Theriogenology*,59,651-74.
- Mogas T., 2014. In 30^{ème} colloque scientifique de l'AETE, Dresden, Allemagne. www.aete.eu.
- Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Oka C., Kasai M and Takahashi K., 2003. *Hum Reprod* 18,384-391.
- Nibart M., 1982. In ITEB Editions, *La transplantation embryonnaire chez les bovins*. Paris, France. 113-119.
- Nivet A.L., Bunel A., Labrecque R., Belanger J., Vigneault C., Blondin P., Sirard M.A., 2012. *Reproduction*, 143 (2), 165-171.
- Paez J.G., Lin M., Beroukhim R., Lee J.C., Zhao X., Richter D.J., Gabriel S., Herman P., Sasaki H., Altshuler D., Li C., Meyerson M., Sellers W.R., 2004. *Nucleic Acids Res*, 32:71.
- Paula-Lopes F.F., Lima R.S., Strapa R.A., Barros C.M., 2013. *J. Anim. Sci.*, 91(3), 1143–1153.
- Pedersen L.D., Kargo M., Berg P., Voergaard J., Buch L.H., Sorensen A.C., 2012. *J. Anim. Breed. Genet.*, 129, 152–163.
- Peippo J., Viitala S., Virta J. et al, 2007. *Mol. Reprod. Dev.*,74(11), 1373-1378.
- Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruip T. A., Taverne M. A. 1988. *Theriogenology*, 30,751-762.
- Pieterse M., Vos P., Kruip T., Wurth Y., Van Beneden T., Willemsse A., Taverne M., 1991, *Theriogenology*, 35,19-24.
- Pimentel E.C.G., Bauersachs S., Tietze M., Simianer H., Tetens J., Thaller G., Reinhardt F., Wolf E., König S., 2011. *Anim. Genet.*, 42(3), 251–262.
- Polisseni J.S, WJ, Guerra Mde O., Machado M.A., Serapiao R.V., Carvalho B.C., Camargo L.S., Peters V.M., 2010. *Fertil. Steril.*, 93(3), 783–788.
- Ponsart C., Le Bourhis D., Knijn H., Fritz S., Guyader-Joly C., Otter T., Lacaze S., Charreaux F. Schibler L., Dupassieux D., Mullaart E., 2014. *Reprod., Fert. Dev.*, 26, 12–21.
- Ponsart, C., Marquant-Le Guienne, B., Humblot, P. 2004. 11^{èmes} Renc. Rech. Rum. 8-9 décembre 2004, Paris, 361-368.

Pontes J.H.F., Melo Sterza F.A., Basso A.C., Ferreira C.R., Sanches B.V., Rubin K.C.P., Seneda M.M., 2011. *Theriogenology* 75, 1640–1646.

Pontes J.H.F., Silva K.C.F., Basso A.C., Rigo A.G., Ferreira C.R., Santos G.M.G., Sanches B.V., Porcionato J.P.F., Vieira P.H.S., Faifer F.S., Sterza F.A.M., Schenk J.L., Seneda M.M., 2010. *Theriogenology*, 74, 1349–1355.

Pryce J.E., Daetwyler H., 2012. *Anim. Prod. Sci.*, 52, 107-114.

Pryce J.E., Hayes B.J., Goddard M.E., 2012. In "Proceedings of the 38th ICAR session, Cork", 28 Mai - 01 Juin 2012, www.icar.org.

Ren Z., Zeng H.T., Xu Y.W., Zhuang G.L., Deng J., Zhang C., Zhou C.Q., 2009. *Fertil Steril.* 91(2):359-364.

Renard J.P., 1982. In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 89-93.

Renard, J.P., Heyman, Y., Dumesnil du Buisson, F., 1977. *Theriogenology*, 7, 189-194.

Rowson, L., Moor, R.M., Lawson, R.A.S., 1969. *J. Reprod. Fert.*, 18, 517-523.

Sargolzaei M., Vigneault C., Blondin P., Schenkel F., and Chesnais, J., 2012. Dairy Cattle Breeding and Genetics Committee Meeting, 18 September 2012. Available at: http://lirpa.aps.uoguelph.ca/elares/sites/default/files/msargol_Embryo_Genotyping_Project.

Sørensen M.K., Voergaard J., Pedersen L.D., Berg P., Sørensen A.C., 2011. *J. Anim. Breed. Genetics.* 128:267–275

Stringfellow D.A., Givens M.D., 2009. In *International Embryo Transfer Manual*, 4th Edition (IETS Publish., Savoy, USA). 151 pp.

Thibier M., 2014. In 30^{ème} colloque scientifique de l'AETE, Dresden, Allemagne. www.aete.eu.

Thibier M., Nibart M., 1995. *Theriogenology*, 43,71-80.

Thibier M., Wrathall T., 2012. *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*, 1-4

Tissier M., Ponsart C., Regaldo D., Mervant G., Humblot P., 2004. In Merial Editions, 20^{ème} réunion AETE, Lyon, France.

Tominaga K., Iwaki F, Hochi S., 2007. *J Reprod Dev.*, 53(2), 443-447.

Touati K., Bormans M., Ectors F., Massip A., 1990. *Ann. Méd. Vét.*, 134, 249-251.

Treff N.R., Jing S., Tao X., Northrop L.E., Scott R.T., 2001. *Mol. Hum. Reprod.*, 17(6), 335-343.

Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H., 1998. *Mol. Reprod. Dev.*, 51,53-58.

Vajta G., 2000. *Anim. Reprod. Sci* 60-61 : 357-364.

Van Wagendonk-De Leuw, A.M., Den Daas J.H.G., Rall, W.F., 1994. *Theriogenology*, 326.

Vieira L.M., Rodrigues C.A., Castro Netto A., Guerreiro B.M., Silveira C.R.A., Moreira R.J.C., Sá Filho M.F., Bó G.A., Mapletoft R.J., Baruselli P.S., 2014. *Theriogenology*, 82(2), 318-325.

Voelkel S.A., Hu Y.X., 1992. *Theriogenology*, 37,1117-1131.

Willett E.L., Black W.G., Casida L.E., Stone W.H., Buckner P.J., 1951. *Science*, 113:247.