

# Les biotechnologies de l'embryon bovin, évolution et perspectives

C. PONSART, B. MARQUANT-LEGUIENNE, P. HUMBLLOT

UNCEIA Département R&D, 94703, Maisons Alfort

**RESUME** - Les biotechnologies de la reproduction basées sur l'utilisation d'embryons bovins ont été développées à partir de l'année 1975. La technique de transfert embryonnaire augmentant le nombre de produits des femelles d'élite par superovulation puis transfert à l'état frais des embryons chez des receveuses a été vite utilisée dans les programmes de sélection en substitution de l'IA pour produire les futurs reproducteurs. Ceci a été suivi par la mise au point de techniques de congélation et de sexage des embryons maintenant utilisées en routine, puis par le développement de méthodes basées sur la production d'embryons *in vitro* à partir d'ovocytes récoltés à l'abattoir ou chez l'animal vivant. L'évolution des résultats obtenus avec ces techniques et leur utilisation actuelle et future dans les schémas de sélection sont ici décrites. Tout particulièrement, les liens possibles avec l'utilisation des marqueurs génétiques existants ou futurs dans le cadre de la sélection multi-caractères sont envisagés.

## Evolution and future trends for the use of embryo based biotechnologies in cattle

C. PONSART, B. MARQUANT-LEGUIENNE, P. HUMBLLOT

UNCEIA Département R&D, 94703, Maisons Alfort

**SUMMARY** - Reproductive biotechnologies based on the use of bovine embryos have been developed since 1975. Rapidly, embryo transfer techniques allowing to increase the number of offspring by superovulation of high genetic merit cows followed by transfer of *in vivo* produced embryos to recipients have been used as a substitute to AI to produce young bulls for progeny testing. In addition to this, freezing and embryo sexing methods have been developed and are now routinely used. *In vitro* embryo production either from slaughterhouse material or from living females by Ovum Pick Up was achieved more recently. This paper describes improvements and limitations of the results obtained with these techniques and their present or future use in genetic schemes. Possible links with the use of marker assisted selection (MAS) will be most particularly discussed.

### INTRODUCTION

La première biotechnologie mise au point à partir de matériel embryonnaire a été le transfert embryonnaire (TE). A la suite des premiers essais réalisés essentiellement en station, cette technique a été utilisée dans les schémas de sélection au début des années 1980 à partir de collectes et de transferts réalisés en ferme (Nibart 1982, Heyman 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). Un premier objectif est de décrire ici l'évolution des résultats de ces techniques basées sur la production d'embryons *in vivo* et d'identifier certains facteurs qui, malgré les améliorations enregistrées, en limitent encore l'efficacité et l'application.

A partir de la fin des années 1980, les techniques de production *in vitro* d'embryons ont été maîtrisées dans l'espèce bovine (Goto *et al.*, 1988, Aoyagi *et al.*, 1989, Marquant Leguienne *et al.*, 1989) et ont permis d'envisager le développement d'applications nouvelles, initialement basées sur l'utilisation d'ovocytes collectés sur les ovaires d'animaux abattus, puis chez l'animal vivant (technique d'*Ovum Pick Up* par voie transvaginale ; Pieterse *et al.*, 1988, 1991). De nombreuses améliorations ont été apportées à ces techniques au cours des années 1990 à 2000. Le clonage embryonnaire puis somatique a été réalisé dans de nombreuses espèces et son intérêt pour les programmes de sélection discuté (Colleau *et al.*, 1998, Colleau *et al.*, 3R 2004). Compte tenu des rendements actuels, l'intérêt de ces méthodes par rapport au transfert embryonnaire apparaît plus ou moins important suivant la nature des schémas de sélection (Van Arendonk et Bijma, 2003, Tissier *et al.*, 2004) et leur utilisation est encore très variable en fonction des pays ou des organismes de sélection. Les avantages potentiels que les techniques de production *in vitro*

procurent par rapport au TE classique seront envisagés ici dans l'optique de l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs (SAM), actuellement en plein développement. Les données portant sur le clonage illustrées dans un autre article ne seront pas abordées ici.

### 1. EVOLUTION DES RESULTATS DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE

#### 1.1. ACTIVITE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE

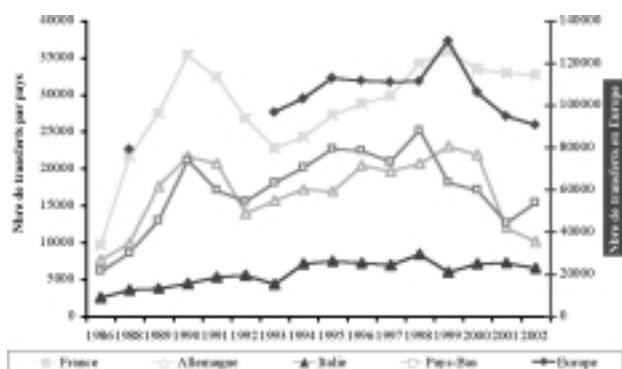
En France, quelques centaines de transfert ont été réalisés avant les années 1980, essentiellement en station. Un Programme National mis en œuvre par l'INRA, les Services Techniques de l'UNCEIA, 4 unités de sélection et IMV a été initié pour organiser le pré-développement de cette technique. Les apports de ce programme ont été à l'origine du développement rapide du TE et de son utilisation intensive dans les schémas de sélection.

Le transfert embryonnaire a connu en France son plus fort développement entre 1985 et 1990 (figure 1 ; Ponsart *et al.*, 2003). Une augmentation de l'activité a été également observée dans d'autres pays européens, notamment les Pays-Bas et l'Allemagne, avec quelques années de décalage. Les évolutions ont été ensuite similaires. En 1992 et 1993, une forte baisse de l'activité de TE a été observée dans tous les pays européens, en relation avec le renforcement du dispositif de maîtrise de la production laitière adopté en 1992. A partir de 1994, une reprise de l'activité a été observée. En 2000, le nouveau décrochement observé s'explique par les crises de l'ESB et de la fièvre aphteuse, qui ont été suivies d'une chute d'activité très importante au niveau européen (-30 % entre 1999 et 2002), en particulier en Allemagne et aux Pays-Bas. Aux Pays-Bas, cette diminution a sans doute été accentuée par le remplacement d'une partie de l'activité de TE au profit de la production d'embryons *in vitro*. (S Merton, communication personnelle).

## 1.2 RESULTATS DE SUPEROVULATION

En 20 ans, un gain d'environ 2 embryons viables par collecte a été observé. Ceci est lié à la forte augmentation de la réponse moyenne à la superovulation pendant cette période (tableau 1). Il est surprenant de constater que la proportion d'embryons viables n'a pas augmenté depuis le début de l'utilisation de la technique, stagnant entre 50 et 60 %. De même, la proportion de donneuses non collectées (par rapport aux donneuses traitées) est restée relativement stable entre 1981 et 1995, passant de 10 % à 6 % (source AETE, d'après Ponsart *et al.*, 2003). L'amélioration du nombre d'embryons totaux et viables vient principalement d'une diminution de la proportion de collectes sans embryon transférable, passée d'environ 40 % en 1981 (Nibart, 1982) à environ 15 % ces dernières années (Manciaux *et al.*, 2003).

**Figure 1** : évolution du nombre d'embryons transférés en France et en Europe depuis 1986 (source AETE, d'après Ponsart *et al.*, 2003)



**Tableau 1** : évolution des résultats de production d'embryons après superovulation en France (d'après Nibart, 1982 ; Ponsart *et al.*, 2003, source AETE)

Année	1981	1986	1995	2002
Donneuses traitées	1214	2840	7139	-
Donneuses collectées	-	2471	6680	6979
Embryons viables / collecte	3,4*	4,8	4,8	5,6
Embryons totaux / collecte	5,4*	8,6	9,0	9,7
% viabilité	63 %	55 %	53 %	57 %

Une première vague d'amélioration est observée dans les années 1980 (tableau 1). Celle-ci résulte principalement de la mise au point de protocoles de superovulation plus performants, utilisant des préparations de FSH à la place de traitements PMSG (*Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* ; la nomenclature internationale semble privilégier l'utilisation du terme eCG, *equine Chorionic Gonadotrophin*) et préconisant l'administration biquotidienne de FSH à doses décroissantes (Chupin et Procureur 1982). De plus, les préparations à base de FSH d'origine porcine et / ou ovine, devinrent plus pures et présentaient un rapport FSH / LH plus stable (Nibart et Humblot, 1997a). La mise en place à ce moment d'une réglementation assurant un meilleur niveau sanitaire des donneuses a certainement également contribué à améliorer les résultats. L'augmentation du nombre moyen d'embryons viables par collecte observée depuis 1995 pourrait être expliquée par une meilleure préparation des donneuses prenant en compte la dynamique de croissance folliculaire (Guilbault *et al.*, 1991; Ede *et al.*, 1999), l'utilisation de nouveaux traitements, comme par exemple la mise en place d'un implant progestatif pendant 5 jours lors de la

superovulation (Govignon *et al.*, 2000) et enfin une meilleure maîtrise des facteurs d'environnement dans l'élevage, en particulier de l'alimentation. Plusieurs travaux ont en effet montré les effets défavorables de la suralimentation sur la réponse des donneuses (Negrao *et al.*, 1997). En dépit des progrès enregistrés, l'absence de réponse ou une réponse faible au traitement de superovulation restent fréquents. Ceci limite toujours l'application de cette technique à des fins commerciales, rend difficile l'exploitation de certaines souches de femelles et engendre des surcoûts dans la conduite des schémas de sélection. Globalement, l'origine paternelle des donneuses d'embryons est une source de variation pour toutes les variables de la réponse au traitement de superovulation. Les moyennes de production (nombre d'embryons totaux ou de transférables) peuvent varier du simple au triple en fonction de l'origine paternelle (Manciaux *et al.*, 1999, Govignon *et al.*, 2000).

## 1.3. RESULTATS DE GESTATION APRES TRANSFERT

### 1.3.1. Résultats après transfert d'embryons à l'état frais

Le premier veau issu de transfert embryonnaire est né en 1951. 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. Cependant, cette technique étant lourde et contraignante, des travaux ont été menés à partir de 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 (tableau 2). 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). Cette méthode, facile à mettre en œuvre, a largement contribué au développement de la transplantation embryonnaire, mais, depuis sa mise au point, les résultats ont finalement peu évolué et restent proches de 55 % (tableau 2). Cependant, depuis 1995, l'évolution de l'organisation des collectes et des transferts d'embryons (nombre de donneuses et de receveuses) et l'utilisation croissante de la congélation n'ont pas été favorables à l'amélioration des résultats après transfert des embryons à l'état frais. En effet il est noté un accroissement du nombre moyen de donneuses traitées pour être collectées le même jour et une diminution de la qualité moyenne des embryons transférés à l'état frais, les embryons de meilleure qualité étant sélectionnés pour la congélation (Bourgoin *et al.*, 2004 ; tableau 3).

### 1.3.2. Evolution des résultats avec les techniques de cryoconservation.

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 % (tableau 2). La dilution du cryoprotecteur en une seule étape dans une solution de sucre au moment des opérations de

**Tableau 2** : évolution des taux de gestation après transfert d'embryons à l'état frais ou congelé

Année Technique	1975-1980	1979-1981	1990-2002		2000-2003
	CHIR	CERV	Glycérol	Ethylène Glycol	CERV-FERME
Embryons frais	37 % =>65 % (160) S 54,6 % (279) S	32 % (1391) F 20 % => 50 %	59,8 % (1727) 53,3 (4410) 55-61 % 68,3 % (9023)		55,8 % (5064)
Référence	Nibart, 1982 Heyman, 1982	Nibart, 1982	Otter, 1994 Ponsart <i>et al.</i> , 2000 Lopes <i>et al.</i> , 2001 Hasler 2001		UNCEIA, 2003
Embryons congelés	35,2 % (85) S	32 % (1391) F 51,2 % (39) S	45,1 % (335, TC) 62,3 % (3570, TC) 48 % (4846, TD) 47,2 % (1265, TD) 40,4 % (84, TD)	50,5 % (1236) 55,4 % (869) 48,1 %- 58,6 % (488) 56,1(3616) 58,4 % (5297) 45,4 % (88)	49,1 % (4440 TD)
Référence	Renard, 1982	Nibart, 1982 Renard, 1982	Van Wagendonk, 1994 Otter, 1994 Nibart et Humblot 1997 Ponsart <i>et al.</i> , 2000 Martinez <i>et al.</i> , 2002	Nibart et Humblot 1997 Ponsart <i>et al.</i> , 2000 Hasler 2001 Martinez <i>et al.</i> , 2002	UNCEIA, 2003

S Transfert réalisés en Station, F Transferts réalisés en ferme, TD Transfert direct, TC Transfert classique (1 ou plusieurs étapes de dilution)

**Tableau 3** : influence de l'année et de l'organisation d'un chantier de travail sur les taux de gestation (résultats UNCEIA - URCEO ; 3336 chantiers, 14929 transferts à l'état frais)

Facteur étudié	% gestation	% chantiers avec congélation	Qualité moyenne des embryons*
Année			
1995 (n=463)	52,3 %	43 % <sup>a</sup>	1,83±0,50 <sup>a</sup>
2002 (n=477)	52,3 %	64 % <sup>b</sup>	1,66±0,52 <sup>b</sup>
Type de chantier			
Frais seul	55,2 % <sup>a</sup>	0 % (n=1620)	1,68±0,54 <sup>a</sup>
Frais+congelé	49,7 % <sup>b</sup>	100 % (n=1716)	1,81±0,43 <sup>b</sup>
Nbre de donneuses par opérateur			
1 (n=2655)	53,1 % <sup>a</sup>	48,8 % <sup>a</sup>	1,74±0,50
≥ 1 (n=681)	49,9 % <sup>b</sup>	61,5 % <sup>b</sup>	1,75±0,44

\* transférés par chantier à l'état frais, notés selon la grille IETS

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, les taux de développement après mise en culture des embryons congelés / décongelés ont atteint les 80 % et des taux de gestation supérieurs à 50 % ont été obtenus après transfert. Par la suite, cette technique a très rapidement été utilisée sur le terrain et selon les études les taux de gestation rapportés varient de 45 à 60 % (tableau 2). Le transfert d'embryons congelés en ferme a ainsi connu un essor significatif à partir de 1982, pour dépasser le millier en 1983 (Nibart et Thibier, 1987). 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 sur la combinaison glycérol - saccharose (Touati *et al.*, 1990). L'efficacité du transfert direct étant identique à celle de la méthode classique, il a été très largement adopté (Massip, 2003). Bien que des résultats équivalents aient été obtenus dans les études ayant comparé les deux méthodes (tableau 4), c'est la méthode basée sur l'utilisation de l'éthylène glycol qui s'est le plus développée

(sans doute grâce à la simplicité des milieux utilisés et donc du conditionnement en paillettes).

**Tableau 4** : comparaison des taux de gestation (%) observés après transfert direct et classique.

Transfert Méthode	Direct		Classique
	Ethylène Glycol	Glycerol Sucrose	Glycerol
Voelkel & Hu, 1992	39		62
Aarts <i>et al.</i> , 1994	55,5		54
Lange, 1995	58,2		40,9
Dochi <i>et al.</i> , 1995	60	69	
Nibart, Humblot, 1997b	50,5	48,5	
Ponsart <i>et al.</i> , 2000	55,4	47,2	
Résultats de l'ACTE* (Ponsart, 2002)	58	59,2	

\*Association canadienne de Transfert Embryonnaire

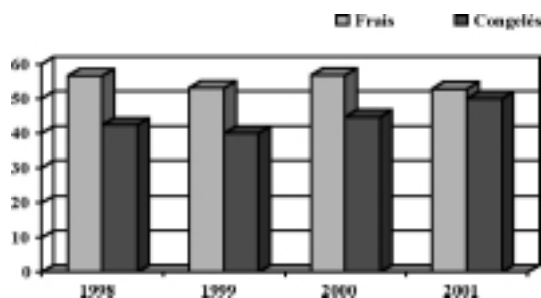
En 2001, plus de 74 % des embryons congelés / décongelés en Europe l'ont été par cette méthode (Heyman et Joly, 2002). Au Canada également, cette méthode est utilisée majoritairement (Ponsart, 2002). En France, elle a nettement influencé l'organisation des transferts, en augmentant nettement la proportion de transferts réalisés "au coup par coup" sur chaleur naturelle, ce qui donne plus de souplesse à l'éleveur pour utiliser ses embryons congelés. Les années 1990-2000 ont également été marquées par la mise au point de la vitrification, méthode de cryoconservation extrêmement simple, visant à obtenir un embryon à l'état "vitreux", par remplacement plus important de l'eau intracellulaire par des agents cryoprotecteurs en plus haute concentration couplée à un refroidissement ultrarapide (Massip *et al.*, 1987). Cette technique rapide ne nécessite pas d'appareil de congélation puisque les paillettes contenant les embryons sont plongées directement dans l'azote liquide. Des résultats encourageants ont été obtenus depuis 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 SOPS (Isachenko *et al.*, 2003), combinée à l'utilisation d'appareils permettant des descentes ultrarapides en température ont amélioré la méthode. Toutefois, les résultats ne sont pas

vraiment supérieurs à ceux obtenus après utilisation des méthodes dites de congélation à l'équilibre. De plus, il est plus difficile d'appliquer cette méthode de façon tout à fait répétable en ferme, du fait du manque de "souplesse" des protocoles, lié à la toxicité des cryoprotecteurs utilisés à fortes concentrations et à l'enchaînement d'étapes d'équilibration extrêmement courtes et précises. Les méthodes classiques de congélation associées au transfert direct des embryons restent donc aujourd'hui les plus largement utilisées. Pour l'instant, du fait du conditionnement en paillettes scellées, elles présentent également de meilleures garanties au plan sanitaire. On note une progression continue des transferts d'embryons après congélation / décongélation (tableau 3). Au cours du dernier exercice, après transfert d'embryons congelés, les taux de gestation à 90 jours estimés de façon contemporaine à partir de grands nombres de transferts sont seulement inférieurs de 5 à 6 % par rapport à ceux obtenus après transfert d'embryons à l'état frais (tableau 2). Toutefois, le fait que les meilleurs embryons soient retenus pour la congélation explique en partie cette faible différence (*cf. supra*).

#### 1.4. SEXAGE DE L'EMBRYON

La technique du sexage des embryons utilisée en France a été élaborée initialement en 1990 conjointement par l'INRA, les laboratoires Mérieux et l'UNCEIA. Une biopsie (prélèvement de quelques cellules de l'embryon par micro-manipulation sous microscope) est réalisée. Le sexage de la biopsie est réalisé par extraction de l'ADN, amplification de la séquence spécifique de l'ADN du mâle par PCR suivie de la séparation de l'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose : deux bandes d'amplification sont obtenues pour un mâle (bande correspondant à l'amplification de la séquence mâle plus bande autosomale) tandis qu'une seule bande (autosomale) est observée pour une femelle. La technique du sexage est efficace à 95 %, ce qui revient à dire qu'on obtient un résultat de sexage pour 95 % des embryons biopsiés. L'exactitude est bonne : plus de 98 % des veaux nés sont effectivement du sexe attendu (Thibier et Nibart 1995). Des techniques de sexage ne nécessitant pas d'électrophorèse ont été développées (Bredbacka 1998) mais elles offrent moins de garanties puisqu'elles ne permettent pas de discriminer les biopsies ne contenant pas suffisamment d'ADN des biopsies issues d'un embryon femelle (pas de séquence autosomale amplifiée).

**Figure 2** : évolution des taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés entre 1998 et 2001 (résultats UNCEIA)



Du fait de l'intérêt porté à la fois aux embryons mâles et aux embryons femelles dans les schémas de sélection, le développement de cette technique est resté modeste malgré les résultats encourageants obtenus. En 1998, les taux de gestation après biopsie embryonnaire obtenus en ferme par les équipes adhérentes à l'UNCEIA ont été de 56 % pour les embryons

frais et de 42 % avec embryons congelés. Depuis, les résultats obtenus pour les embryons congelés se sont améliorés et sont compris entre 45 et 50 % (figure 2). Depuis l'année 2000, la méthode développée par le Département R&D de l'UNCEIA a été simplifiée afin de diminuer le temps de sexage (celui-ci est maintenant de l'ordre de 2 heures). Ce raccourcissement du temps de sexage rend plus facile l'organisation du chantier de sexage et la réalisation de transferts à l'état frais. Cette technique a été utilisée préférentiellement par les équipes de certaines unités de sélection chez les femelles de haute valeur génétique ayant présenté une forte réponse à la superovulation. Les données les plus récentes issues de "OGER embryons" à partir des campagnes 2003 et 2004 indiquent une moyenne de 8 biopsies traitées par chantier de sexage (329 biopsies pour 41 chantiers). Le taux de biopsies pour lesquelles le résultat est indéterminé est très faible et proche de 1 % (4 / 329) ce qui confirme les résultats antérieurs. Pour les deux campagnes, les taux de gestation ont dépassé 70 % (110 / 153). Les variations du taux de gestation sont liées principalement à la parité des receveuses (comme dans le cas du transfert "classique", de meilleurs résultats sont obtenus lorsque les transferts sont réalisés chez des génisses) et à l'habileté du technicien qui réalise la biopsie.

## 2. PRODUCTION D'EMBRYONS *IN VITRO* : EVOLUTION DES TECHNIQUES ET DES RESULTATS

### 2.1 PRODUCTION DE BLASTOCYSTES

#### 2.1.1. A partir de matériel d'abattoir

Depuis les premiers essais de production *in vitro* d'embryons 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 ont considérablement évolué. Les premiers systèmes étaient basés sur la co-culture des embryons avec des cellules d'oviducte ou de cumulus (tableau 5). 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).

**Tableau 5** : évolution des techniques de co-culture des embryons bovins.

Type cellules	% morula.-blastocyste	Auteur
Cumulus	21 %	Goto <i>et al.</i> , 1988
Oviducte	21 %	Menck <i>et al.</i> , 1997
Trophoblaste	51 %	Aoyagi <i>et al.</i> , 1989
BRL	22 %	Voelkel et Hu., 1992
Vero	29,5 %	Menck <i>et al.</i> , 1997

Enfin des méthodes de culture à base de milieux "chimiquement définis", en l'absence de cellules (avec ou sans sérum ajouté), ont été développées (tableau 6). Dans de tels milieux, tels que le SOF (*Synthetic Oviductal Fluid*), 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 l'albumine bovine sérique (ABS). Pour un même laboratoire, on note une progression des résultats avec les années et l'évolution des systèmes de culture (tableau 7). Des variations très importantes d'une manipulation à l'autre subsistent encore dans les rendements de production à partir d'ovocytes récoltés à l'abattoir.

**Tableau 6** : taux de développement après culture dans le milieu SOF avec ou sans sérum et ABS (Carolan *et al.*, 1995)

Traitement	ABS	% blastocystes
SOF + sérum	Avec	29 %
SOF	Avec	28 %
SOF	Sans	18 %

**Tableau 7** : évolution des taux de développement après différents types de culture (ovocytes issus d'abattoirs, UNCEIA non publié).

Traitement	Periode	% blastocystes
Coculture cellules oviducte	1990-1995	23,9 % (5583 / 23363)
Coculture cellules Vero	1996-2004	24,6 % (6396 / 25960)
Milieu défini (SOF)	1999-2004	29 % (5412 / 18645)

Il est en effet difficile de contrôler avec efficacité la qualité des ovocytes (et des vaches donneuses) qui peuvent être en outre soumis à des conditions d'environnement défavorables lors de la récolte et du transport vers le laboratoire. Au cours des dernières années, les principales tentatives d'amélioration de la production d'embryons *in vitro* ont porté sur la qualité des ovocytes avant fécondation par modification des conditions de maturation. Les milieux de maturation qui stimulent la synthèse de glutathion (GSH) par le complexe ovocyte-cumulus améliorent les taux de développement embryonnaire ultérieurs (De Matos *et al.*, 2002). Il a ainsi été montré récemment que l'addition de cystéamine (antioxydant) au milieu de maturation permet non seulement d'augmenter significativement le GSH intra-ovocytaire, mais également les taux de segmentation et de développement embryonnaire. Ceux-ci approchent ou dépassent 50 % dans de nombreux travaux (Oyamoda et Fukui, 2004). En outre, compte tenu de la meilleure aptitude au développement des ovocytes issus de stades folliculaires plus avancés (Lonergan *et al.*, 1994) et des ovocytes maturés *in vivo* par rapport aux ovocytes maturés *in vitro* (Greve *et al.*, 1987, Marquant Leguienne *et al.*, 1989, Dieleman *et al.*, 2002, Rizos *et al.*, 2002, Humblot *et al.*, 2004), des efforts ont également été faits pour tenter de mimer les conditions de maturation *in vivo* en ajoutant dans un premier temps des facteurs de croissances présents dans le follicule comme l'EGF (Lonergan *et al.*, 1996). Une autre approche a consisté à prolonger la maturation de l'ovocyte *in vitro* en le cultivant en 2 étapes (Objet du contrat Union Européenne QLK3-CTI1999-00104). Dans un premier temps, la reprise de la méiose est bloquée artificiellement, ce qui laisse plus de temps pour compléter la maturation cytoplasmique. Ensuite, l'inhibition est levée et il est possible d'espérer une maturation plus uniforme pour l'ensemble de la population d'ovocytes. L'utilisation de molécules inhibant la reprise de méiose telles que la Butyrolactone-I ou la Roscovitine utilisées seules ou en association, n'a pas permis d'améliorer les rendements en terme de production de blastocystes. Toutefois il semble que les produits obtenus (embryons et veaux) soient normaux (Ponderato *et al.*, 2003) et qu'une courte période d'inhibition ou de pré-maturation permette plus de souplesse dans l'organisation des OPU en ferme en permettant l'allongement du transport des ovocytes jusqu'au laboratoire de fécondation *in vitro* ou le regroupement des fécondations d'ovocytes récoltés à des moments différents (Marquant-Le Guienne *et al.*, 2004).

A la suite des premiers essais de production *in vitro* et de l'utilisation de ces méthodes sur le terrain, plusieurs études ont fait

état d'avortements plus nombreux et de difficultés à la naissance. Ces dernières pourraient résulter d'une augmentation du poids moyen des veaux et de l'allongement de la durée de gestation (Large Offspring Syndrome, LOS- Vasquez *et al.*, 1995, Kruijff et Den Daas, 1997). Les auteurs rapportent des fréquences de 34 % et de 5,7 % de poids supérieur à 50 kg et 60 kg respectivement, pour des veaux de race Holstein issus d'embryons *in vitro* alors que ces fréquences sont de 7,4 % et 0,3 % après IA. Une augmentation de la fréquence des césariennes et de la mortalité périnatale est également observée. Il semble que l'évolution des systèmes de culture - et en particulier la généralisation de systèmes de culture sans sérum - permette de limiter l'étendue de ces différences. Des données récentes obtenues en race Montbéliarde et Abondance ne montrent pas de différence entre le poids moyen des veaux obtenus à partir d'embryons *in vitro* cultivés sans sérum et celui des veaux nés d'insémination (tableau 8). Ceci est en accord avec les observations Galli et Lazzari (2003) qui ont montré que lorsque la culture des embryons est effectuée dans un milieu où l'utilisation de sérum ou d'ABS est limitée, plus de 95 % des gestations sont normales et la fréquence des foetus présentant le LOS est réduite. Hoshi, en 2003, a également montré que la présence de sérum dans un milieu de culture serait à l'origine du LOS.

**Tableau 8** : comparaison des poids de naissance des veaux issus d'OPU-FIV avec des poids moyens de naissance fournis par les UPRAs (Eymard *et al.*, non publié)

Race du veau	Sexe	Poids naissance en kg (moyenne ± erreur type)	Poids moyen référence (kg)
Montbéliarde	M	47,8 ± 1,47 (n=35)	55
	F	45,4 ± 1,16 (n=32)	50
Abondance	M	46,3 ± 2,32 (n=16)	46
	F	45,3 ± 1,45 (n=25)	45

### 2.1.2 Par OPU

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 classique maturation - fécondation - culture *in vitro* jusqu'à l'obtention d'embryons viables qui peuvent être congelés ou remis en place à l'état frais. 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 ou après stimulation ovarienne par la FSH, l'OPU est pratiquée une fois par semaine, une fois toutes les deux semaines ou à intervalles plus espacés (Guyader Joly *et al.*, 1997). Dans ce cas, les doses de FSH utilisées sont généralement inférieures à celles employées dans les protocoles de production d'embryons *in vivo*. Le nombre d'ovocytes collectés et d'embryons produits par semaine après OPU réalisées deux fois par semaine chez quatre femelles sans superovulation pendant trois semaines (13,8 ovocytes et 1,8 embryons par semaine) puis une fois par semaine après superovulation pendant les trois semaines suivantes (15,1 ovocytes et 2,1 embryons) n'ont pas été significativement différents (Lacaze *et al.*, 1997). En moyenne (tableau 9), sur

l'ensemble des 356 sessions effectuées en France sur le terrain (toutes races confondues, résultats après stimulation ovarienne), à partir de 14 ovocytes collectés par session de ponction, 3,9 embryons se sont développés jusqu'au stade blastocyste (soit en moyenne, 28 % de développement embryonnaire à partir des ovocytes collectés).

De même, l'équipe de Holland Genetics produit environ 1 embryon par session à partir de 8 ovocytes collectés deux fois par semaine sans superovulation (soit 2 embryons par

semaine) alors que la production après une collecte par semaine après superovulation est proche de 2 embryons (Baas et Merton, communication personnelle). Les rendements pour la race Holstein sont généralement plus faibles que ceux constatés pour les autres races (en moyenne 2,6 blastocystes transférables produits par session). Pour une même race, les rendements obtenus par différentes équipes sont équivalents. Les taux de rendement sont fortement influencés par le taureau utilisé pour la FIV.

**Tableau 9** : nombre d'ovocytes collectés et d'embryons produits par session d'OPU (sessions réalisées dans le cadre des schémas de sélection, toutes races confondues, UNCEIA non publié)

Année	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Nb sessions	13	44	45	70	48	70	66
Nb ovocytes collectés	15 ± 6,8	14,9 ± 11,5	15,4 ± 8,7	14,4 ± 8,2	12,8 ± 8,4	13,8 ± 8	13,1 ± 6,6
Nb blastocystes	5,8 ± 3,2	4,6 ± 4,9	5,4 ± 5	4,1 ± 4,3	2,8 ± 3,1	3,1 ± 2,5	3,5 ± 3,1
% Développement	38,6 %	30,8 %	35 %	28 %	21,8 %	22,5 %	26,7 %

Les rendements de production de blastocystes peuvent varier du simple au double d'un taureau à l'autre (Marquant Leguienne *et al.*, 1992, Marquant Leguienne et Humblot 1992). De plus, des données récentes montrent que la production d'embryons est également largement influencée par la femelle donneuse d'ovocytes et pourrait être sous contrôle génétique (Tamassia *et al.*, 2004).

## 2.2. TAUX DE GESTATION APRES TRANSFERT

### 2.2.1. Résultats après transferts à l'état frais

Les embryons issus des sessions d'OPU-FIV réalisées en ferme ont été obtenus dans un système de co-culture en présence de cellules Vero. A partir des 356 sessions, en moyenne 2,9 embryons ont été transférés à l'état frais par session (soit 21 % des ovocytes ponctionnés). En moyenne, 1,6 gestations / session ont été obtenues à J35 (55,1 % de gestations par rapport aux embryons transférés) et 1,4 à J90 (soit 11,5 % et 10,3 % par rapport aux ovocytes de départ à J35 et J90 respectivement).

Des taux de gestation équivalents ont été obtenus après culture des embryons en milieu SOF (55,7 % 767 / 1377) (Merton communication personnelle). Comme pour les embryons produits *in vivo*, on note également l'effet prononcé de la qualité des embryons évaluée avant transfert (classification IETS, Marquant-Leguienne et Humblot 1998) sur les résultats (embryons de qualité Q1 : 52 / 96 = 54 %, Q2 22 / 53 41,5 % et Q3 12 / 39 30,8 %, résultats UNCEIA, 2000-2001, données non publiées).

### 2.2.2 Evolution des résultats avec les techniques de cryoconservation.

#### - Congélation à l'équilibre

De nombreux travaux ont montré que les embryons issus de culture *in vitro* sont plus sensibles à la congélation que les embryons produits *in vivo* en partie à cause de leur contenu lipidique globalement plus élevé et de l'enrichissement spécifique en certaines classes de lipides tels que les triglycérides (Abd El Razek *et al.*, 2000, Charpigny *et al.*, 2002). L'évolution des taux de gestation observés après transfert direct d'embryons congelés / décongelés issus d'ovaires d'abattoirs et cultivés en présence de cellules Vero (figure 1) montre bien que les taux de gestation avoisinent 50 % à partir du moment où les embryons sont cultivés en l'absence de sérum (Marquant-Leguienne *et al.*, 2001, Brevet N°FR 00 / 07096).

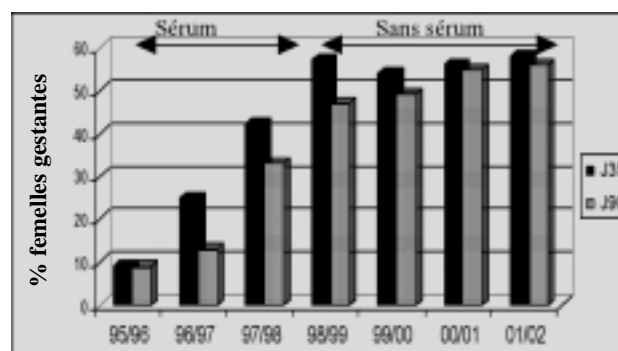
Des taux de gestation équivalents ont été obtenus après culture des embryons issus d'OPU-FIV dans du milieu SOF en l'absence de sérum à partir de protocoles de congélation /

décongélation classique dans le glycérol (440 / 868 50,7 % Merton, communication personnelle) ainsi que par quelques équipes dans le monde.

#### - Vitrification

La vitrification peut présenter des avantages pour la congélation des embryons sensibles car il n'y a pas en théorie de formation de cristaux de glace et l'embryon est exposé moins longtemps aux gammes de température induisant le "cold shock" (Massip, 2003).

**Figure 3** : évolution des résultats de gestations après transfert direct des embryons congelés (Transferts en station ; Marquant-Leguienne *et al.*, 2001, UNCEIA 2002-2003)



Au cours des 15 dernières années une vingtaine de combinaisons différentes pour la vitrification des embryons ont été publiées mais les données sur les taux de gestation après transfert des embryons produits *in vitro* ne sont pas nombreuses (tableau 10). La vitrification reste une technique peu utilisée car les taux de gestation, proches de 40 %, ne sont pas réellement plus élevés qu'après congélation classique, et il n'existe pas encore de technique de référence présentant toutes les garanties au plan sanitaire.

**Tableau 10** : taux de gestation après transfert d'embryons vitrifiés produits *in vitro*.

Congélation	N receveuses	N embryons	Gestations	Auteurs
Classique	17	34	6 / 17(35 %)	Lane <i>et al.</i> , 1999
Vitrification	15	30	6 / 30(40 %)	Lewis <i>et al.</i> , 1998

Par ailleurs, les avantages au plan pratique sont réduits car les embryons doivent être montés en paillette et congelés un par un alors que ceci peut être fait par lots avec les méthodes de congélation classique. Le gain de temps est nul si le

nombre d'embryons à congeler est de 15 à 25. Par ailleurs la résistance à la congélation des embryons produits *in vitro* peut être améliorée en modifiant les conditions de culture (figure 3) et des taux de gestation élevés ont été obtenus après congélation "classique". Ceci amène à réserver la (les) technique(s) de vitrification aux domaines où les techniques classique ne permettent pas d'obtenir de bons résultats (congélation des stades plus précoces *i.e.* avant compaction, des embryons porcins et équins...)

### 3. BIOTECHNOLOGIES DE L'EMBRYON ET SCHEMAS DE SELECTION

Du fait de l'augmentation du nombre de descendants issus des femelles d'élite et de la qualité sanitaire des produits issus de transfert (Thibier 1990), la transplantation embryonnaire a très vite été perçue par les généticiens comme un outil intéressant pour la diffusion du matériel génétique, l'augmentation des performances au niveau de troupeaux individuels et plus généralement comme vecteur d'accélération du progrès génétique dans les schémas de sélection (Cunningham 1976, Petersen et Hansen, 1977, Bradford et Kenny 1980, Colleau 1981 cités par Menissier 1982). Considérée initialement comme une technique d'appoint dans ces schémas, elle s'est progressivement imposée par rapport à l'IA classique, du moins dans les pays et pour les races où des programmes de sélection importants sont conduits. En France, plus de 80 % des taureaux entrant en station de testage sont issus de transfert embryonnaire (Malafosse ; communication personnelle, Tissier *et al.*, 2004). Du fait de l'augmentation potentielle du progrès génétique due principalement à l'augmentation de la pression de sélection sur la lignée femelle et aux gains de variabilité liés à l'utilisation de mâles différents pour une même femelle, (Colleau *et al.*, 1998), l'OPU associée à la production d'embryons *in vitro* est utilisée maintenant dans les schémas de sélection. Cependant, l'utilisation est variable selon les pays. En Europe, une utilisation importante est rapportée en Allemagne, en Italie et aux Pays-Bas (Heyman 2002, Galli *et al.*, 2003, Merton *et al.*, 2003), alors que le TE reste la biotechnologie de l'embryon la plus utilisée dans les schémas français. Les difficultés pratiques de mise en œuvre (variabilité des résultats en particulier chez les femelles jeunes, progrès à réaliser dans maîtrise de la résistance à la congélation...) et l'augmentation des coûts dans les schémas de grande taille sont sans doute la source des disparités importantes observées. Cependant, Tissier *et al.*, 2004 rapportent une augmentation des coûts modérée (140 à 150 % par rapport au TE) lors de l'application chez les primipares Montbéliardes et indiquent que ce surcoût peut être compensé par les avantages en terme de variabilité génétique (multiplication par 2 des combinaisons possibles père / grand-père maternel). Les avantages de l'OPU / IVP en termes d'intensité de sélection et de variabilité peuvent devenir décisifs lors de sélection pour les caractères fonctionnels. Ces caractères deviennent de plus en plus importants du fait des bénéfices économiques engendrés par la sélection (liés aux progrès vis à vis du statut sanitaire des animaux, des réformes et de l'amélioration des conditions de travail (Ashwell *et al.*, 2004, Pryce *et al.*, 2004). Cependant, la sélection sur des caractères multiples conduit à la mise en œuvre de programmes de sélection complexes où les animaux rassemblant un nombre important de caractères d'intérêt sont recherchés. Dans ce contexte, l'utilisation de l'OPU / IVP a été

envisagée dans des stratégies pour optimiser le progrès génétique tout en limitant la consanguinité (Van Arendonk et Bijma, 2003). Ceci est permis par la conception de plans d'accouplements factoriels dans lesquels à la fois les mâles et les femelles sont accouplés avec plusieurs individus du sexe opposé. Répéter les sessions d'OPU / IVP sans affecter le potentiel de reproduction, surtout si l'on considère la possibilité de les associer avec les techniques émergentes liées aux progrès de la génomique et de la SAM, représente un avantage majeur par rapport au TE. Le génotypage des embryons et leur sélection avant transfert peut être également dans le futur la source de bénéfices importants en limitant le nombre de transferts à réaliser. Cependant, plusieurs problèmes techniques dus notamment aux difficultés pour réaliser de nombreux typages sur des quantités de matériel embryonnaire nécessairement limitées doivent être résolus.

### CONCLUSION

Le TE reste la biotechnologie de l'embryon la plus utilisée dans les schémas de sélection français. 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 substantiels surtout lorsque l'on considère la possibilité de les intégrer avec la SAM, les nouvelles technologies issues de la génomique ou encore le tri de la semence.

Dans ce contexte complexe, les collaborations entre généticiens et spécialistes de la reproduction sont plus que jamais nécessaires pour définir les modèles et les simulations utiles pour la conduite future des schémas de sélection et choisir les biotechnologies de l'embryon les plus appropriées pour répondre aux objectifs des Unités de Sélection.

*Nous remercions Isabelle Martin-Sportiello pour sa précieuse collaboration.*

- Aarts T., Hurkmans H., Klop 1., Van Rixtel J., Van Lieshout J., 1994. In Editions Merieux. 10ème Réunion AETE, Lyon. 140.
- Abd El Razek I., Charpigny G., Kodja S., Marquant-Leguienne B., Mermillod P., Guyader Joly C., Humblot P., 2000. Theriogenology, 53,346 (Abstr.).
- Aoyagi Y., Fukui Y., Iwazumi M., Minegishi Y., 1989. Theriogenology, 81, 168.
- Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, Van Raden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA., 2004. J Dairy Sci. ; 87,468-75.
- Bourgoin G., Quinton H., Rohou A. *et al.* 2004. *Reprod., Fert. and Dev.*,16,207.
- Bredbacka P., 1998. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38,605-613.
- Carolan C., Lonergan P., Van Longendonck A., Mermillod P. 1995 Theriogenology 43 : 1115-1128.
- Charpigny G., Guesnet P., Marquant-Leguienne B., Heyman Y., Mermillod P., Humblot P., 2002. In Actes 4ème colloque BRG, BRG Editions, La Châtre, 159-172.
- Chupin D., Procureur R., 1982. In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 75-83.
- Colleau JJ, Heyman Y, Renard JP., 1998. *INRA Prod. Anim.*,11,41-56.
- Colleau JJ., Frirz S., Druet T., Bechu J., Laurent Y., Humblot P., Renard JP., Boichard D., 2004. Communication 3R.
- De Matos DG., Herrera C., Cortvrintd R., Smitz J., Van Soom A., Nogueira D., Pasquilini RS., 2002. *Mol. Reprod. Dev.*, 62,203-209.

- Dieleman S., Hendrikssen P.J., Viuff D., Thomsen P.D., Hyttel P., Knijn H.M., Wrenzicky C., Kruip T., Niemann H., Gadella B.M., Bevers M.M., Vos P.L., 2002.** *Theriogenology*, 57, 5-20.
- Dochi O., Imai K., Takakura H., 1995.** *Animal Reproduction Science*, 38,179-85 ;
- Ede P., Florin B., Khodja S., 1999.** In Merial Editions, 15<sup>ème</sup> réunion AETE, Lyon, 148.
- Galli C., Lazzari G., 2003.** In Merial Editions, 19<sup>ème</sup> réunion AETE, Rostock, 93-101.
- Galli C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G., 2003.** *Theriogenology*, 59,599-616.
- Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Kobam Y., Nakashi Y., Ogawa K., 1988.** *J. Reprod. Fert.*,83,753-758.
- Govignon A., Rohou A., Ponsart C., Delcroix P., Humblot P., 2000.** In Merial Editions, 16<sup>ème</sup> réunion AETE, Santander, 158
- Greve T., Xu X.P., Callesen H., Hyttel P., 1987.** *J IVF Embryo transfer*, 4,281-285.
- Guilbault L.A., Grasso F., Lussier J.G., Rouillier P., Matton P., 1991.** *J.Reprod.Fert.*, 91,81-89.
- Guyader Joly C, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant-Leguienne B, Humblot P., 1997.** *Theriogenology*, 47,157 (Abstr.).
- Hasler J., 2001.** *Theriogenology*, 56,1401-1415.
- Heyman Y., 1982.** In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 105-111.
- Heyman Y., 2002.** In Merial Editions, 18<sup>ème</sup> réunion AETE. Rolduc, 31-79.
- Heyman Y., Joly T., 2002.** Newsletter AETE.
- Hoshi H. 2003.** *Theriogenology*, 59,675-685.
- Humblot P., Holm P., Lonergan P., Wrenzycki C., Lequarre A.S., Lopes A., Guyader Joly C., Ponchon S., Rizos D., Callesen H., 2004.** *Theriogenology (Sous Presse)*.
- Isachenko V., Folch J., Isachenko E., Nawroth F., Krivokharchenko A., Vajta G., Dattena M., Alabart J.L., 2003.**
- Kruip T., Den Daas N., 1997.** *Theriogenology*, 47,43-52.
- Lacaze S., Marquant-Le Guienne B., Delalleau N., Richet L., Maunas S., Nibart M., Humblot P. 1997.** *Theriogenology*, 47, 161.
- Lane M. W., Ahern T. J., Lewis I.M., Gardner D.K., Peura T.T. 1998.** *Theriogenology*, 49,170.
- Lange H., 1995.** *Theriogenology*, 43, 258
- Lewis I.M., Lane M.W., Vajta G. 1999.** *Theriogenology*, 51, 168.
- Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M., Gordon I., 1994.** *Mol. Reprod. Dev.*, 37,48-53.
- Lonergan P. Carolan C., Van Langendonck A., Donnay I. Kathir H, Mermillod P. 1996** *Biol. Reprod.* 54 : 1420-1429.
- Lopes R.F., Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L., 2001.** *Theriogenology*, 56, 1383-1392.
- Manciaux L., Ponsart C., Grisouard D., Humblot P., 1999.** In Merial Editions, 15<sup>ème</sup> réunion AETE. Lyon, 200.
- Manciaux L., Mariani E., Humblot P., Ponsart C., 2003.** In Merial Editions, 19<sup>ème</sup> réunion AETE. Rostock, 186.
- Marquant-Le Guienne B., Gerard M., Solari A., Thibault C., 1989.** *Reprod. Nutr. Dev.*, 29,559-568.
- Marquant-Leguienne B., Humblot P., Guillon N., Gerard O., Thibier M. 1992.** In Proceedings 12<sup>th</sup> ICAR congress, La Haye, Vol 1, 662-664.
- Marquant-Leguienne B., Humblot P., 1992.** *Annales de Zootechnie*, 41,361-370.
- Marquant Leguienne B., Humblot P., 1998.** *Theriogenology*, 49,3-11.
- Marquant-Leguienne B., Guyader-Joly C., Ponchon S., Dellaleau N., Florin B., Ede P., Ponsart C., Guerin B., Humblot P., 2001.** *Theriogenology*, 55,433 (Abstr.).
- Marquant-Le Guienne B., Clement L., Ponchon S., Joly C., Gonzalez C., Ede P., Morel A., Florin B., Mermillod P., Humblot P. 2004** Affiche 3R N°203.
- Martinez A.G., Brogliatti G.M., Valcarcel A., De Las H., 2002.** *Theriogenology*, 58,963-972.
- Massip A., Van der Zwalmen P., Ectors F., 1987.** *Theriogenology*, 27,69-79.
- Massip A., 2003.** *Reprod. Nutr. Dev.*, 43,325-330.
- 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.
- Ménissier F., 1982.** In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 95-104.
- 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.
- Negrão S., Nibart M., Humblot P., 1997.** In Merial Editions, 13<sup>ème</sup> réunion AETE.Lyon, 186 (Abstr.).
- Nibart M., 1982.** In ITEB Editions, La transplantation embryonnaire chez les bovins. Paris, France. 113-119.
- Nibart M., Thibier M., 1987.** In Merial Editions, 3<sup>ème</sup> réunion AETE, Lyon, 27-39
- Nibart M., Humblot P., 1997a.** In COMBARNOUS Y., VOLLAND-NAIL P. (Editors), Les gonadotropines. INRA Editions ed., Paris. 377-394.
- Nibart M., Humblot P., 1997b.** *Theriogenology*, 47, 371 (Abstr.)
- Otter T., 1994.** In Merial Editions, 10<sup>ème</sup> Réunion A.E.T.E., Lyon, 228.
- Oyamoda T., Fukui Y., 2004.** *J. Reprod. Dev.* 50,107-117.
- 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.
- Ponderato N., Crotti G., Turini P., Duchi R., Galli C., Lazzari G. 2002.** *Mol. Reprod. Dev.*, 62,513-518.
- Ponsart C., Delcroix P., Rohou A., Jupin L., Humblot P., 2000.** In Merial Editions, 16<sup>ème</sup> réunion AETE.192.
- Ponsart C., 2002.** *Elevage et Insémination*, 308,27-32.
- Ponsart C., Caplin S., Humblot P., 2003.** In AERA - Les techniques de reproduction artificielle, Maisons-Alfort, 5-12.
- Pryce J.E., Royal M.D., Garnsworthy P.C., Mao I.L., 2004.** *Livestock Production Science* ; 86, 125-35.
- 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.
- Rizos D., Lonergan P., Ward F., Duffy P., Boland M., 2002.** *Mol. Reprod. Dev.*, 61,234-248.
- Rowson L., Moor R.M., Lawson R.A.S., 1969.** *J. Reprod. Fert.*, 18, 517-523.
- Tamassia M., Heyman Y., Lavergne Y., Richard C., Gelin V., Reanrd J.P., Chastant Maillard S., 2003.** *Reproduction*, 126, 629-637.
- Tissier M., Ponsart C. Regaldo D., Mervant G., Humblot P., 2004.** In Merial Editions, 20<sup>ème</sup> réunion AETE, Lyon, France. Sous Presse.
- Thibier M. 1990.** In Merial Editions, 6<sup>ème</sup> réunion AETE, Lyon, 67-81.
- Thibier M., Nibart M., 1995.** *Theriogenology*, 43,71-80.
- Touati K., Bormans M., Ectors F., Massip A., 1990.** *Ann. Méd. Vét.*, 134, 249-251.
- 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 Arendonk J., Bijma P., 2003.** *Theriogenology*, 59, 635-649.
- Van Wagendonck-De Leuw, A.M., Den Daas J.H.G., Rall, W.F., 1994.** *Theriogenology*, 326.
- Vasquez I., Horta A.E.M., Marques C., Sasser R.G., Humblot P. 1995.** *Anim. Reprod. Sci.*, 38,279-289.
- Voelkel S.A., Hu Y.X., 1992.** *Theriogenology*, 37,1117-1131.