

DU DIAGNOSTIC PRÉIMPLANTATOIRE AU SUIVI DE TROUPEAU : QUE PEUT APPORTER LA GÉNOMIQUE AUX ÉLEVEURS ?

FROM PREIMPLANTATION DIAGNOSIS TO HERD MONITORING: WHAT DOES GENOMICS BRING TO BREEDERS?

Claire PONSART⁽¹⁾, Daniel LE BOURHIS⁽¹⁾, Marion BENOIT⁽²⁾, Stéphane BARBIER⁽²⁾
(Communication présentée le 28 novembre 2013)

RÉSUMÉ

La sélection génomique est aujourd'hui pleinement appliquée dans les programmes de sélection menés par les entreprises de sélection françaises Prim'Holstein, Normande et Montbéliarde. Dans un premier temps, le génotypage a été principalement valorisé par les entreprises dans la mise en œuvre des schémas de sélection. Optimiser les techniques de reproduction est devenu un axe stratégique, en combinant la production d'embryons, l'utilisation de la superovulation et du transfert d'embryon (TE), ainsi que la ponction d'ovocytes. Aujourd'hui, 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. En outre, depuis l'ouverture du service de génotypage aux éleveurs bovins laitiers français en 2011, la sélection génomique s'installe à grands pas au sein des élevages des races Montbéliarde, Prim'Holstein, Pie Rouge et Normande. En élevage, le génotypage des femelles est un nouvel outil de management, facilitant le tri des génisses de renouvellement, permettant d'affiner les accouplements par un choix des taureaux optimisé, de contrôler la consanguinité au niveau génétique et d'anticiper les plans d'accouplement (choix du mode de reproduction et/ou utilisation de semence sexée). Ces applications doivent permettre d'atteindre des pratiques de reproduction durables, au niveau collectif autant qu'individuel et devraient encore évoluer avec l'amélioration continue des outils de génotypage.

Mots-clés : génotypage, sélection génomique, embryon, diagnostic préimplantatoire.

SUMMARY

Genomic selection is now fully implemented in breeding programs conducted by French breeding companies in Holstein, Normande and Montbeliard breeds. Initially, genotyping has been implemented by companies in selection schemes. This method enables to estimate the genetic potential of an animal at birth, thus shortening considerably the schedule of selection schemes and lowering its cost. In this context, optimizing reproductive biotechnologies has become a strategic priority. This may be achieved through different scenarii combining production of *in vivo* derived embryos and embryo transfer (ET) and the oocyte retrieval. Nowadays, one of the major challenges for reproductive biotechnologies is the realization of a pre-implantation diagnosis, from a small number of cells taken from the embryo, which opens new perspectives. In addition, since the opening of a genotyping service to French dairy farmers in 2011, genomic selection moved apace in farms from Montbeliard, Holstein, Red Pie and Normande breeds. In farms, genotyping of females is a new management tool enabling to sort heifers from birth, to refine the choice of bulls for an optimized breeding management, to control inbreeding together with genetic level and to anticipate breeding plans (choice of reproduction type and / or use of sexed semen). These tools may help to reach sustainable breeding practices, at collective and individual levels and are expected to evolve with the continuous optimization of genotyping tools.

Key words: genotyping, genomic selection, embryo, pre-implantation diagnosis.

(1) UNCEIA, Département R&D, 13 rue Jouët, 94704 MAISONS-ALFORT.

(2) VALOGENE, 149 rue de Bercy, 75595 PARIS cedex.

SÉLECTION GÉNOMIQUE : OUTIL D'AIDE À LA DÉCISION POUR LES BIOTECHNOLOGIES DE LA REPRODUCTION

En France, l'orientation de l'amélioration génétique des bovins au niveau des populations est définie, par race, par les Organismes de Sélection (OS). Établis en 2007 par la loi d'orientation agricole, chacun d'eux réunit les différents membres d'une filière raciale (éleveurs, opérateurs, utilisateurs) pour dialoguer et guider les objectifs vers des intérêts communs. Ces axes d'amélioration sont retranscrits au travers des index de synthèse, comme l'indice de synthèse unique (ISU) dans le cas des troupeaux bovins laitiers en France (Indexation Bovine Laitière, 2012). Les programmes de sélection sont réalisés à l'initiative des entreprises de sélection (ES). La mission des ES relève de la création et de la fourniture de progrès génétique aux éleveurs. Pour cela, les ES évaluent les reproducteurs de la base de sélection et les sélectionnent pour ne diffuser que la semence des meilleurs mâles. La sélection génomique permet désormais de décider de diffuser un taureau à grande échelle dès les premières semaines de sa vie, voire à l'état embryonnaire. Ceci bouleverse grandement le travail des ES ainsi que l'organisation de l'ensemble du secteur de l'insémination. 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). Ceci explique la part croissante des jeunes taureaux évalués avec la génomique au détriment des taureaux évalués par la méthode classique polygénique parmi les taureaux utilisés en IA (*figure 1*).

Dans un schéma avec contrôle sur descendance, l'évaluation du reproducteur repose sur la procréation d'un nombre suffisant de filles d'un taureau pour évaluer les caractères que l'on ne peut mesurer directement sur lui (la production laitière par exemple). Il fallait alors au minimum 6 ans et près de 50 000 € d'investissement par taureau avant de disposer d'informations dont la précision satisfasse les conditions réglementaires *sine qua non* de sa commercialisation (coefficient de détermination (CD) au moins égal à 0,50 pour le lait par exemple). 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. Dans ce contexte, optimiser l'utilisation des biotechnologies de la reproduction, de l'insémination à la production d'embryons *in vitro* représente un levier supplémentaire pour accélérer le progrès génétique et augmenter les chances de procréer des candidats intéressants.

Utilisation des biotechnologies de la reproduction chez des femelles génotypées dans le cadre de la sélection

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 et en améliorant la précision de la sélection (*tableau 1*). Avec la sélection génomique, le potentiel génétique des reproducteurs est connu beaucoup plus rapidement mais l'augmentation de la pression de sélection nécessite de nombreux candidats. Dans ce contexte, l'utilisation de biotechnologies permettant de géné-

% des IA selon la catégorie de taureaux

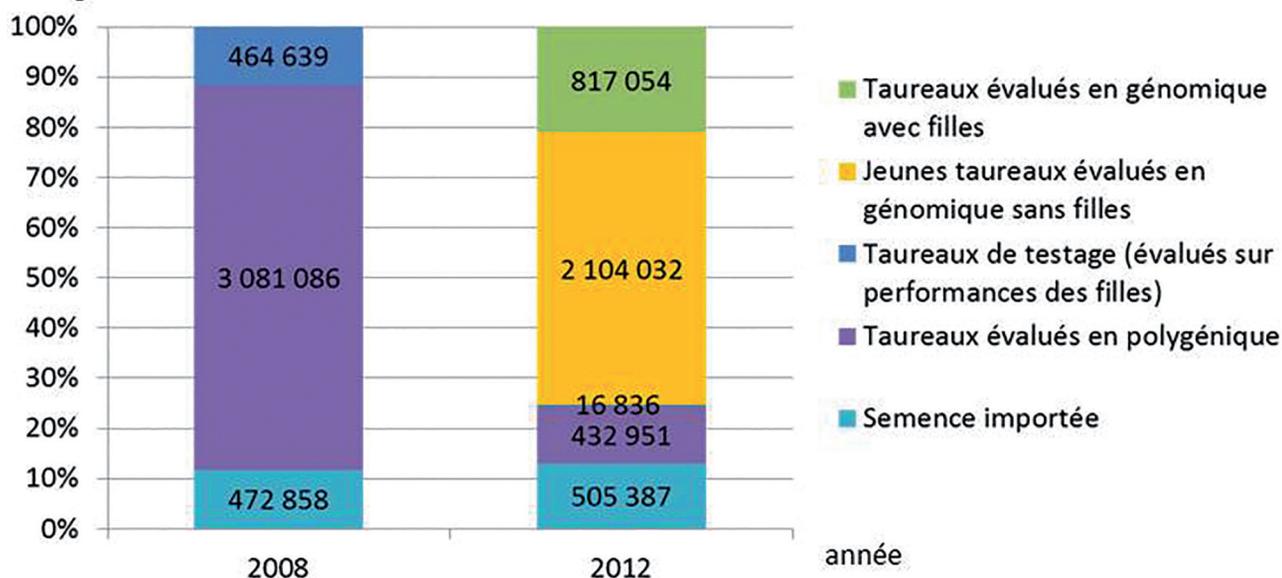


Figure 1 : Diffusion des taureaux d'insémination Prim'Holstein en fonction des méthodes d'évaluation génétique (d'après Le Mezec *et al.*, 2013).

rer un grand nombre de candidats à évaluer dans une période donnée est une stratégie qui peut accélérer le progrès génétique pour les caractères sélectionnés (Humblot *et al.*, 2010), d'autant plus que les animaux sont désormais évalués sur des caractères, plus nombreux, incluant des aptitudes fonctionnelles moins hérissables. 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 (Ponsart *et al.*, 2013). Dans les deux cas, le génotypage conduit à l'identification de femelles d'élite qui pourront ensuite être mises à la reproduction, soit en utilisant de la semence sexée, soit en pratiquant des sessions de production d'embryons en vue d'un transfert sur des receveuses (**tableau 1**).

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 à la sélection (ce qui conduit à 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). Par rapport à la superovulation combinée à la collecte d'embryons *in vivo*, le nombre d'embryons produits dans une période de temps donnée peut même être multiplié par 2 ou 3 par l'utilisation de collectes répétées d'ovocytes associée à un système de culture *in vitro* (Humblot *et al.*, 2010).

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. De même, raccourcir l'intervalle de génération peut tendre à accroître le taux de consanguinité d'où l'intérêt de schémas permettant de contrôler une telle augmenta-

Impact sur les composantes du progrès génétique (+ positif / - négatif)					
	Précision	Intensité	Variation génétique	Héritabilité	Intervalle de génération
Liens entre les biotechnologies de la reproduction et le progrès génétique	Génotypage des femelles = population de référence plus large (et phénotypage possible)	Plus de candidat(e)s dans une période de temps donnée ou réduction du nombre de candidat(e)s sélectionné(e)s	Utilisation intensive d'un nombre limité de taureaux / mère à taureaux ; accouplements raisonnés	Sélection de nouveaux caractères, avec une hérissabilité faible	+ (plus) ou - (moins) de candidat(e)s dans une période donnée
Génotypage des femelles et semence sexée	+++ (selon utilisation du génotypage, taille de la population)	+ (plus de candidats via la naissance de veaux de sexe contrôlé, détection des femelles d'élite)	++ (plans d'accouplement basés sur les informations génomiques)	Caractères fonctionnels des femelles	+ (sexe des veaux contrôlé, détection précoce de femelles d'élite)
Superovulation et transfert d'embryons (TE)	+ (fonction de l'utilisation des collectes, taille du noyau de sélection)	++ (nombre limité de donneuses, collectes à intervalle de 6 ou 7 semaines)	- (consanguinité) +(diversité des accouplements)	Nouveaux caractères (production d'embryons <i>in vitro</i> , donneuse)	+ (plus de veaux à âge fixé) Et / ou + congélation <transfert à l'état frais)
Production d'embryons <i>In vitro</i> (PIV)	+ (fonction de l'utilisation des collectes, taille du noyau de sélection)	+++ (nombre limité de donneuses, ovocytes collectés à intervalle de 1 à 2 semaines)	- (consanguinité) + (diversité des accouplements)	Nouveaux caractères (production d'embryons <i>in vitro</i> , donneuse)	++ Collecte d'ovocytes chez de jeunes génisses (à la puberté ou prépubères)
Clonage embryonnaire	?	+++ (> 1 veau à partir de quelques donneuses)	- (approche individuelle)	Nouveaux caractères (clonage, donneuse)	+++ (clones de cellules souches ou cellules embryonnaires)
Génotypage embryonnaire	+ (fonction de l'utilisation des embryons, taille du noyau de sélection)	+++ (sélection de l'embryon avant TE)	++ plus de candidats produits - (sélection de l'embryon avant TE)	Nouveaux haplotypes	- (Congélation) ++ (sélection précoce des candidats puis TE)

Tableau 1 : Biotechnologies de la reproduction et impact sur les composantes du progrès génétique (d'après Ponsart *et al.*, 2014)

tion (Humbloot *et al.*, 2010 ; Pedersen *et al.*, 2012). L'utilisation du génotypage femelle donne la possibilité de contrôler la consanguinité par l'utilisation de plans d'accouplement ou 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 maladies génétiques, en particulier dans le cas de mutation létale (Clay, 2012 ; Pryce *et al.*, 2012).

Nouveaux caractères permettant de mieux cibler les femelles candidates à 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. Ainsi, à court terme, il devrait être prochainement possible de sélectionner les vaches donneuses, avec l'amélioration des caractères de fertilité, une meilleure aptitude à la production d'embryons ou à la cryopréservation des gamètes. Beaucoup de progrès peuvent être réalisés pour optimiser les biotechnologies de l'embryon, en utilisant l'effet puissant de la sélection génomique comme levier. 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 dans l'ensemble, les coefficients d'héritabilité (de l'ordre de 0,15 - 0,2) sont bien supérieurs à ceux rapportés antérieurement pour la fertilité après IA.

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 (puce Illumina bovine LD; Illumina Inc., 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122 USA), 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 entre les caractères de reproduction et les effets secondaires possibles sur la production, la longévité ou la résistance aux maladies 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, tels une liste supplémentaire de SNP (Paula Lopes *et al.*, 2013).

Diagnostic pré-implantatoire à 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, le nombre d'embryons à transférer est limité par un diagnostic du sexe avant transfert grâce à la technique de biopsie d'embryons combinée à la PCR (polymerase chain reaction ; Bondioli *et al.*, 1992 ; Lopes *et al.*, 2001). Elle consiste à prélever des cellules embryonnaires, puis d'amplifier leur acide désoxyribonucléique (ADN) et de révéler une séquence spécifique du chromosome Y. 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.*, 2013).

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 géné-

tique 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.*, 2013). L'amplification du pan-génome (méthode whole genome amplification (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.*, 2009). 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 avec la puce Affymetrix® et la puce de 54 000 SNP, SNP50® commercialisée par 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 ; Polissen *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, la mesure de l'amplification du génome n'est pas nécessairement proportionnelle à la quantité d'ADN de départ. L'amplification déséquilibrée de locus hétérozygotes peut entraîner des phénomènes d'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), représentant 6,8 % des erreurs de réplication (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**). 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 restent inférieurs à ceux obtenus à partir de prélèvements sanguins chez les animaux vivants (**tableaux 2 et 3**). Cependant, lorsque l'on compare les marqueurs hétérozygotes (SNP) de chaque couple embryon / veau, 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 (**tableau 3** cf légende du tableau).

Référence	Nombre de cellules par biopsie	Nombre de biopsies	CR moyens (mean ± s.e.M)
Le Bourhis <i>et al.</i> , 2011	5–7	12	85 ± 8 ^a
	8–10	14	90 ± 4 ^b
Fisher <i>et al.</i> , 2012	1	17	77.6 ± 6.2
	3	18	85.5 ± 2.8
	> 1/2 morula	6	96.3 ± 1.7

Tableau 2 : Taux moyens de détection des marqueurs (CR, Call Rates) après pré-amplification de biopsies embryonnaires par la technique WGA et génotypage avec une puce Illumina BovineSNP50TM selon le nombre de cellules (d'après Ponsart *et al.* 2014).

Source	Nombre de biopsies	CR (%)	% biopsies présentant un CR > 85 %
CRV, unpublished data	251	94.2 ± 7.8	91,5
Le Bourhis <i>et al.</i> , 2012	117	87.7 ± 12.5	85.5

Tableau 3 : Taux moyens de détection des marqueurs (CR, Call Rates) après pré-amplification de biopsies embryonnaires par la technique WGA et génotypage avec une puce Illumina BovineSNP50TM (d'après Ponsart *et al.* 2014).

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. 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 % ; 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, d'utiliser au quotidien des index génomiques estimés pour les caractères d'intérêt particulier et / ou la présence d'anomalies génétiques pour la reproduction, voire de sélectionner au mieux les femelles soumises à certaines biotechnologies de la reproduction. En outre, le diagnostic génétique préimplantatoire combiné avec la congélation et le transfert des embryons ouvre de nouvelles perspectives pour la détection de caractères et mutations spécifiques et facilite largement la gestion des receveuses, en ciblant les embryons candidats à transférer.

SÉLECTION GÉNOMIQUE : NOUVEL OUTIL DE PILOTAGE POUR LES TROUPEAUX

Le génotypage en plein essor dans les troupeaux français

La sélection génomique est aujourd'hui pleinement appliquée dans les programmes de sélection menées par les entreprises de sélection françaises Prim'Holstein, Normande et Montbéliarde. La méthode est efficace lorsque les associations entre marqueurs et phénotypes observées dans la population de référence doivent être conservées chez les candidats. C'est le cas à l'intérieur de chaque race, comme l'ont montré les différentes études de validation (Boichard *et al.*, 2010). En revanche l'outil actuel de permet pas de prédire la valeur d'un candidat d'une race à partir d'une population de référence d'une autre race.

Pour ces trois races, la totalité des taureaux mis en marché est génotypée depuis plusieurs années. Ces taureaux représentent environ 10 % du nombre de mâles génotypés, par les entreprises de sélection françaises, pour le recrutement de leurs candidats.

Des femelles sont également génotypées par les entreprises de sélection, notamment lorsqu'elles sont choisies comme potentielles génitrices des futurs candidats à la monte publique. Dans les autres races, la sélection génomique n'est pas encore disponible de façon officielle au niveau national. La Brune dispose cependant déjà d'une évaluation internationale et les trois principales races allaitantes (Charolaise, Limousine et Blonde d'Aquitaine) d'indicateurs génomiques non officiels déjà très utilisés par les entreprises de sélection.

Depuis l'ouverture, en 2011, du service de génotypage aux éleveurs bovins laitiers français, la sélection génomique s'installe à grand pas au sein des élevages des races Montbéliarde, Prim'Holstein, Pie Rouge et Normande. En effet, alors que le génotypage ne concernait pas plus de 2 000 femelles à la fin de la première campagne, ce sont aujourd'hui plus de 56 000 femelles qui ont été génotypées à la demande de leur propriétaire.

Les besoins des programmes de sélection en termes de génotypages étant relativement stables d'une année à l'autre, l'année 2013 devrait compter au moins 20 000 animaux génotypés (parmi lesquels un peu plus de 300 embryons).

En revanche, comme le montre l'évolution de la demande entre 2011 et 2012 (*figure 2*), il est plus difficile de prévoir le nombre de femelles qui seront sujettes à l'évaluation génomique dans les élevages. Une évidence apparaît cependant d'ores et déjà : l'année 2013 comptera encore plus de femelles génotypées que l'année 2012, puisque ceci est déjà le cas en octobre alors même que la période correspondant au pic d'activité des génotypages commence seulement. La demande de génotypages semble suivre celle des inséminations totales dont le maximum est atteint chaque année pendant l'hiver (*figure 3*). En effet, il est souvent recommandé de réaliser les prélèvements qui serviront au génotypage sur des animaux jeunes : ceci permet ensuite de mieux valoriser l'investissement par le tri plus précoce des animaux à conserver et facilite également le travail de contention puisque les animaux sont souvent plus accessibles en hiver. De plus, l'insémineur, fréquemment préleveur, est plus présent dans l'élevage (notamment parce qu'il est sollicité pour ré-inséminer les mères lorsque les veaux ont environ trois mois). Il faut noter que l'augmentation de la demande de génotypage au printemps 2012 n'est liée à aucun événement technique de la gestion des troupeaux, mais à l'arrivée sur le marché de la puce LD, une technologie qui a permis de fortement diminuer le coût d'un génotypage (Boichard *et al.*, 2012 ; Clay, 2012).

Une offre diversifiée intégrant de nouveaux phénotypes

Depuis 2001, différents caractères fonctionnels (fertilité, longévité, morphologie, taux de cellules dans le lait) sont pris en compte pour maîtriser le taux de cellules dans le lait, stopper la baisse de la fertilité ou encore augmenter la longévité, tout

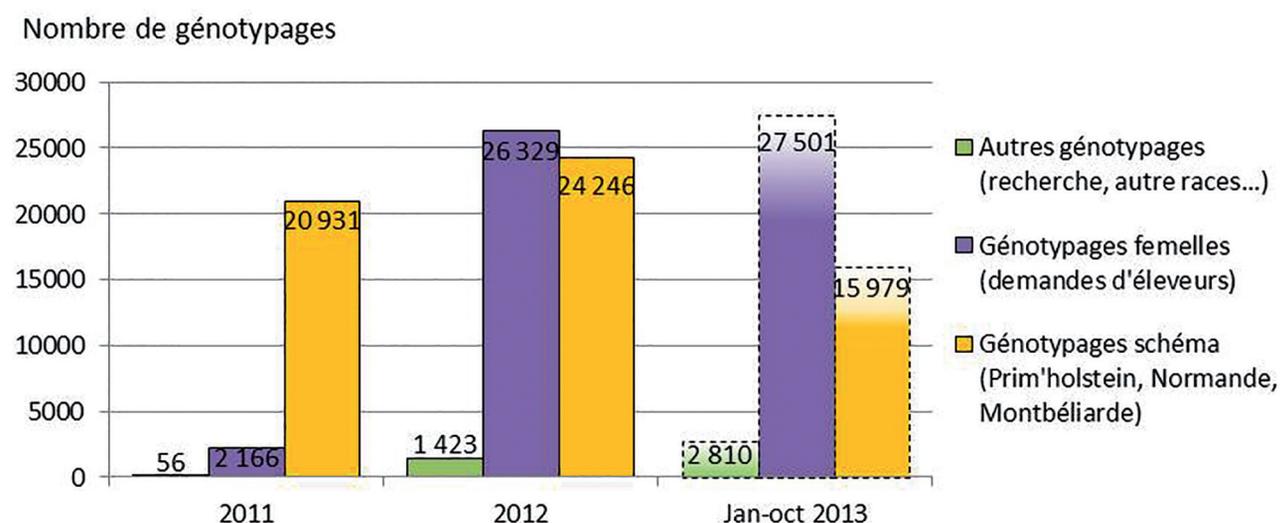


Figure 2 : Nombre de génotypages réalisés en France depuis l'ouverture du service aux éleveurs en 2011 (source Valogene).

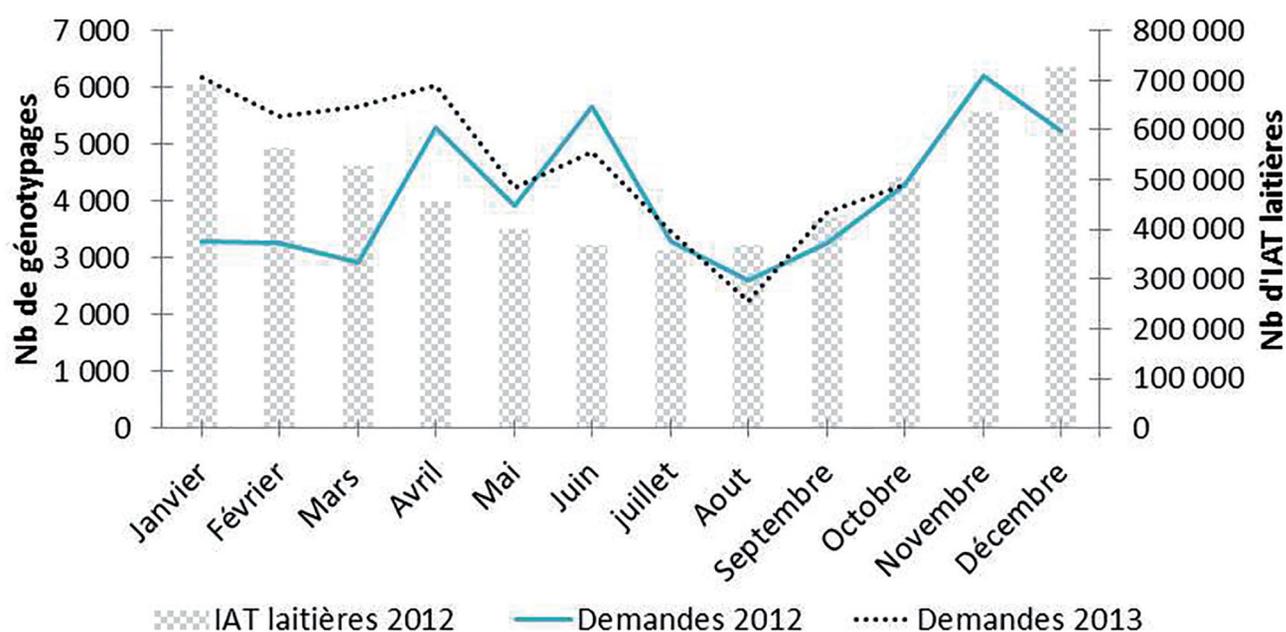


Figure 3 : Évolution du nombre de génotypages réalisés en France en 2012 et 2013, selon les mois (source Valogene).

en maintenant le progrès génétique sur la morphologie. Avec l'évaluation génomique, l'intervalle de génération est raccourci (les animaux sont connus très jeunes et peuvent être vite mis à la reproduction) et la précision des index est améliorée (même des caractères très influencés par le milieu sont évalués avec une bonne précision et de façon similaire pour les mâles et les femelles ; [tableau 4](#) ; Guillaume *et al.*, 2009). De ce fait, avec

les mêmes efforts, des progrès génétiques plus importants deviennent possibles. Pour les trois races Prim'Holstein, Normande et Montbéliarde, les objectifs de sélection ont donc évolué en 2012, avec un nouvel index ISU, intégrant une part plus réduite pour la production et une répartition plus généreuse pour les aptitudes fonctionnelles (Indexation Bovine Laitière, 2012).

		Naissance = 0	4 - 5 ans	3 à 5 ans	Quelques jours
		CD ascendance	CD 1 ^{er} index testage	CD fin 1 ^{ère} lactation	CD SAM
Lait		0,32	0,70		0,60
		0,32		0,47	0,60
Cellules		0,27	0,60		0,60
		0,27		0,40	0,60
Morphologie		0,30	0,60		0,50
		0,30		0,45	0,50
Fertilité femelle		0,22	0,45 (non officiel)		0,50
		0,22		0,25 (non publié)	0,50

Tableau 4 : Comparaison des coefficients de détermination des index dans le temps et selon le type d'indexation (d'après Guillaume et al., 2009).

Avec le développement de l'élevage de précision, la robotisation des troupeaux laitiers d'une part et l'élargissement de la sélection génomique aux caractères de santé (parage, résistance à certaines maladies, thermorésistance) et à l'efficacité alimentaire d'autre part, l'offre « génomique » devrait s'étoffer dans les prochaines années, intégrant de nouveaux caractères fonctionnels associés à la santé, au bien-être animal et visant à répondre à des situations d'élevage variées. Dans ce contexte, l'obtention d'informations phénotypiques précises, fiables, répétibles et comparables entre pays, laboratoires ou entreprises est critique pour acquérir une bonne compréhension de la relation entre les gènes et les phénotypes (Hocquette *et al.*, 2012). Ainsi, certains pays comme Israël développent déjà de larges réseaux de phénotypage basés sur l'utilisation systématisée d'automates pour le management des troupeaux laitiers (Maltz, 2010).

Utilisation du génotypage femelle pour la gestion du troupeau

La diffusion du progrès génétique par la voie mâle, c'est-à-dire le choix des meilleurs taureaux vis-à-vis des objectifs de l'éleveur, est actuellement la principale source d'amélioration génétique intra-troupeau. La voie femelle en est une autre qui, comme l'illustre les chiffres de développement du génotypage femelle, prend de l'importance dans les élevages bovins laitiers français. Peu à peu cette voie de sélection retrouve une place centrale et apporte aux éleveurs la possibilité de développer des stratégies d'élevage novatrices.

Elle consiste à produire les femelles de renouvellement en choisissant préférentiellement les filles des meilleures vaches du troupeau ce qui suppose de connaître leur valeur génétique. Peu précise jusqu'alors, cette voie de sélection femelle était peu efficace. Depuis 2011, l'ouverture du génotypage aux éleveurs permet désormais d'obtenir une précision pour l'estimation génétique des femelles similaire à celle des mâles ce qui était impossible avec la sélection génétique quantitative.

En élevage, le génotypage des femelles peut avoir de nombreux usages (Clay, 2012 ; Dassonneville, 2012) :

- trier les génisses plus précisément pour économiser les 1 000 à 1 200 € de frais d'élevage moyen d'une génisse Prim'Holstein pour un vêlage à 28 mois (Pulvery, 2012 ; Perret, 2012),
- affiner les accouplements par un choix des taureaux optimisés permettant de corriger les défauts et/ou d'accentuer les qualités des femelles individuellement,
- acheter et vendre des animaux (Dupas *et al.*, 2010),
- vérifier et quantifier la pertinence de la conduite génétique du troupeau, identifier les meilleurs animaux,
- contrôler la consanguinité au niveau génétique et non plus seulement généalogique (Pryce & Hayes, 2012) et corriger les erreurs de généalogie. Pour cela, en France, deux types de données sont fournies avec le résultat du génotypage : d'une part, des propositions de parentés en cas d'incompatibilité génétique de l'animal avec ses parents déclarés et, d'autre part, des « index originalité », non officiels, calculés par l'UMT 3G et qui sont souvent intégrés dans les programmes d'accouplement utilisés par les ES et les inséminateurs,
- Préparer le plan d'accouplement (choix du mode de reproduction (monte naturelle, insémination, TE)) et/ou du type de semence (laitière sexée ou non pour le renouvellement, allaitante pour du croisement industriel). En particulier, il faut noter la véritable synergie entre le génotypage femelle et l'utilisation de semence sexée pour la gestion du renouvellement : réaliser le génotypage des génisses permet d'affiner le choix des futures reproductrices du troupeau, tandis que l'utilisation de semence sexée sur un groupe ciblé de femelles permet d'assurer la naissance de veaux femelles (Dassonneville *et al.*, 2012).

Concrètement, les résultats officiels du génotypage sont communiqués à l'éleveur entre 3 et 4 mois après le prélèvement biologique sous la forme de la publication officielle de 35 à 40 index selon la race concernée. Le rendu des résultats s'accompagne

généralement d'une valorisation avec un technicien génétique ou un inséminateur à l'occasion de la préparation du plan d'accouplement. Le délai d'obtention de ces résultats étant principalement dépendant de la fréquence des calculs (6 par an en 2013), des Indicateurs Précoces de Valeur génomique, les IPVgéo, ont récemment été mis en place pour permettre l'obtention d'une valorisation du génotypage dès la première semaine suivant le résultat de l'analyse biologique. Moins fiables que les index, les IPVgéo sont des indicateurs non officiels dont il faut modérer l'interprétation mais qui ont permis d'accélérer nettement les délais de restitution de l'information génomique.

Dans un futur proche, le résultat du génotypage pourra être accompagné d'un certificat de parenté officiel, d'« index originalité » et du statut (porteur ou non) des animaux concernant certaines anomalies génétiques ou gènes d'intérêt tels que le Syndrome d'Hypoplasie Généralisée Capréoliforme, Brachyspina (anomalie notamment responsable de nombreuses malformations de la colonne vertébrale) ou le gène sans corne. Ces informations n'étant pas encore intégrées au service à l'éleveur pour le moment, elles pourront l'aider à affiner encore la gestion du renouvellement de son troupeau.

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 héritables, 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 consanguinité.

REMERCIEMENTS

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,
- équipes de transfert embryonnaire des entreprises de sélection adhérentes à l'action thématique de recherche sur l'embryon : Umotest, Midatest, Amélis, Créavia, CEIA 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.

BIBLIOGRAPHIE

- Akasaka E., Ozawa A., Mori H., Mizobe Y., Yoshida M., Miyoshi K., Sato M.. Whole-genome amplification-based GenomiPhi for multiple genomic analysis of individual early porcine embryos. *Theriogenology* 2011; 75:1543–1549.
- Boediono A., Suzuki T., Godke R.A. Comparison of hybrid and purebred *in vitro* derived cattle embryos during *in vitro* culture. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 78(1–2), 1–11. doi:10.1016/S0378-4320(03)00065-4.
- Boichard D., Guillaume F., Baur A., Colleau J.J., Croiseau P., Boscher M.Y., Ducrocq V., Fritz S.. Principes de l'évaluation génomique chez les bovins laitiers. *Le nouveau praticien Vétérinaire* 2010 ; 4(16), 327–334.
- Boichard D., Chung H., Dasseville R., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., VanRaden P.M., Viaud-Martinez K.A., Wiggins G.R.. Design of a bovine low-density SNP array optimized for imputation. *2012 Plos One* 7 (3): 1–10.
- Bondioli K.R. Embryo Sexing: A Review of Current Techniques and Their Potential for Commercial Application in Livestock Production. *J. Anim. Sci.* 1992;70:19–29. http://jas.fass.org/content/70/suppl_2/19.full.pdf.
- Clay J.S. Aiding selection decisions for dairy females using genomics and sexed semen. In "Proceedings of the 38th ICAR session, Cork". 28 Mai - 01 Juin 2012. Disponible sur : http://www.icar.org/Cork_2012/Manuscripts/Published/Clay.pdf (consulté le 28/11/2013).
- Cochran, S.D., Cole, J.B., Null, D.J., and Hansen, P.J. (2013). Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertilizing ability of sperm and subsequent embryonic development in cattle. *Biol. Reprod.*, In press. doi:10.1095/biolreprod.113.111260.

- Dassonneville R. Genomic selection of dairy cows. Thèse pour l'obtention du grade de docteur délivré par l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement, Paris, 2012 ; 135–156.
- Dassonneville R., Fritz S., Mattalia S., Ducrocq V., Boichard D. Quel est l'intérêt du génotypage des femelles pour l'éleveur ? Salon international de l'Agriculture, Paris, 29 février 2012. Disponible sur : http://idele.fr/fileadmin/medias/Documents/Dassonneville_interet_SG_femelles_SIA_29fev2012.pdf (consulté le 28/11/2013).
- Dean F.B., Hosono S., Fang L., Wu X., Faruqi A.F., Brayward P., Sun Z., Zong Q., Du Y., Du J., Driscoll M. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 2002;99:5261–5266.
- Dupas G., Dockes A-C., Journaux L., Brun T. Quelle place pour le génotypage des femelles laitières à des fins d'évaluation génomique ? Collection résultats. Idele, UNCEIA, FGE, 2010; 48p.
- El-sayed A., Hoelker M., Rings F., Sahliew D., Jennen D., Tholen E., Sirard M-A. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* 2006;28:84–96.
- Fisher P.J., Hyndman D.L., Bixley MJ, Oback FC, Popovic L, McGowan LT, Berg MC, and Wells DN. Brief communication: potential for genomic selection of bovine embryos. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 2012; 72, 156–158.
- Ghanem N., Salilew-Wondim D., Gad A., Tesfaye D., Phatsara C., Tholen E., Looft C., Schellander K., Hoelker M. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction* 2011;142(4), 551–564.
- 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., and Baril, G.. Sex and PRPN genotype determination in preimplantation caprine embryos *Reprod. Domest. Anim.* 2011;46(4), 656–663.
- Guillaume F, Le Mezec P, Mattalia S., Regaldo D., Barbier S., Journaux L., Verrier E.. La révolution génomique, une nouveauté pour la sélection des bovins laitier : la SAM. FGE, 2009 ; Paris, 18p.
- Gunderson K.L., Steemers F.J., Lee G., Mendoza LG, Chee MS. A genomic wide scalabe SNP genotyping assay using microarray technology *Nat Genet* 2005;37(5):549–54.
- Hocquette J.F., Capel C., David V., Guémené D., Bidanel J., Ponsart C., Gastinel P.L., Bail P.Y., Monget P., Mormède P., Barbezant M., Guillou F., Peyraud J.L. Objectives and applications of phenotyping network set-up for livestock. *Anim Sci J.* 2012 Jul;83(7):517–28. doi: 10.1111/j.1740-0929.2012.01015.x
- Humblot P, Le Bourhis D, Fritz S, Colleau JJ, Gonzalez C, Guyader Joly C, Malafosse A, Heyman Y, Amigues Y, Tissier M, Ponsart. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Vet. Med. Int.* 2010 ; 192787. doi: 10.4061/2010/192787.
- Indexation Bovine Laitière N°2012-2. Référence N°001272012. Disponible sur : <http://idele.fr/recherche/publication/idelesolr/recommends/ibl-2012-2-isu-2012-les-objec-tifs-de-selection-evoluent.html> (consulté le 28/11/2013).
- Khatib H, Maltecca C, Monson RL, Schutzkus V, Rutledge JJ. Monoallelic maternal expression of STAT5A affects embryonic survival in cattle. *BMC Genet.* 2009 ; 10, 13. doi: 10.1186/1471-2156-10-13.
- Lacaze S, Humblot P, Ponsart C. Sexage et transfert direct d'embryons bovins biopsies et congelés en ferme dans un programme commercial. *Proceedings Renc. Rech Ruminant* 2008 : 287–290.
- Lacaze S, Ponsart C, Humblot P. Influence of embryo stage on pregnancy rates following transfer of bovine biopsied embryos under on-farm conditions. *Proceedings 25 AETE.* 2009:208.
- Lauri A, Lazzari G, Galli C, Lagutina I, Genzini E, Braga F, Mariani P, Williams J. Assessment of MDA efficiency for genotyping using cloned embryo biopsies. *Genomics* 101(1), 24–29. doi:10.1016/j.ygeno.2012.09.002
- Lazzari G, Colleoni S, Duchi R, Galli A, Houghton FD, Galli C. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. *Reproduction* 2011; 141, 625–632. doi:10.1530/REP-10-0282.
- Le Bourhis D, Amigues Y, Charreaux F, Lacaze S, Tissier M, Guyader-Joly C, Mervant G, Moulin B, Vignon X, Gonzalez C, Humblot P. Embryo genotyping from *in vitro* biopsied bovine embryos after whole genome amplification *Reproduction, Fertility and Development* 2009 ; 21:192.
- Le Bourhis D, Chesne P, Nibart, M Marchal J, Humblot P, Renard JP, Heyman Y. Nuclear transfer from sexed parent embryos in cattle: efficiency and birth of offspring. *J Reprod Fertil* 1998;113(2):343–8.
- Le Bourhis D, Mullaart E, Humblot, Coppieters W, Ponsart C. Bovine embryo genotyping using a 50 k SNP chip. In: 37th Annual Conference of the IETS, 6-12 January 2011, Orlando (Florida) USA. p. 197 (Abstract 193).
- Le Bourhis D, Mullaart E, Schrooten C, Fritz S, Coppieters W, Ponsart C. Breeding values concordance between embryos and corresponding calves. In: 38th Annual Conference of the IETS, Phoenix (Arizona) USA. 7–10 January 2012:180 (Abstract 135).
- Le Mezec P, Barbier S, Journaux L. Du mouvement dans l'insémination : le paysage se redessine, les nouvelles techniques changent les pratiques. BTIA, bulletin technique de l'insémination animale, 2013 ; 149 :16–20.
- Lien S, Kantanen J, Olsaker I et coll. Comparison of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. *Anim Genet* 1999;30(2): 85–91.
- Ling, J., Zhuang, G., Tazon-Vega, B., Zhang, C., Cao, B., Rozenwaks, Z., and Xu, K. (2009). Evaluation of genome coverage and fidelity of multiple displacement amplification from single cells by SNP array. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 739–747. doi:10.1093/molehr/gap066
- Lopes RF, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology.* 2001;56(9):1383–92.
- Lovmar L, Syvanen AC. Multiple displacement amplification to create along-lasting source of DNA for genetic studies. *Hum Mutat* 2006;27:603–614
- Maltz, 2010. Novel Technologies: Sensors, Data and Precision Dairy Farming. The First North American Conference on Precision Dairy Management, Toronto, 2010. Disponible sur : <http://www.precisiondairy2010.com/proceedings/s9maltz.pdf> (consulté le 28/11/2013)
- Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up *in vitro* production embryo-production program. *Theriogenology* 2009; 72, 885–893. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.06.003
- Moulin B, Vignon X, Gonzalez C, Humblot P. Embryo genotyping from *in vitro* biopsied bovine embryos after whole genome amplification *Reproduction, Fertility and Development* 2009 ; 21:192
- Paez JG, Lin M, Beroukhim R, Lee JC, Zhao X, Richter DJ, Gabriel S, Herman P, Sasaki H, Altshuler D, Li C, Meyerson M, Sellers WR. Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification. *Nucleic Acids Res* 2004;32:71.
- Paula-Lopes FF, Lima RS, Strapa RA, Barros CM. Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs *Bos Taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to elevated temperature. *J. Anim. Sci.* 2013; 91(3), 1143–1153. doi: 10.2527/jas.2012-5802

- Pedersen LD, Kargo M, Berg P, Voergaard J, Buch LH, Sorensen AC. Genomic selection strategies in dairy cattle breeding programmes: sexed semen cannot replace multiple oclulation and embryo transfer as superior reproductive technology. *J. Anim. Breed. Genet.* 2012; 129, 152–163. doi:10.1111/j.1439-0388.2011.00958.x
- Peippo J, Viitala S, Virta J et coll. Birth of correctly genotyped calves after multiplex marker detection from bovine embryo microblade biopsies. *Mol Reprod Dev* 2007;74(11):1373–8.
- Perret O. Le renouvellement en élevage laitier, enjeux économiques et optimisation. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 2012 ; 65 : 17–22.
- Pimentel ECG, Bauersachs S, Tietze M, Simianer H, Tetens J, Thaller G, Reinhardt F, Wolf E, König S. Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNP within candidate genes derived by expression profiling. *Anim. Genet.* 2011; 42(3), 251–262. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02148.x
- Polisseni J, S, WJ, Guerra Mde O, Machado, MA, Serapiao RV, Carvalho BC, Camargo LS, Peters VM. Post-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.* 2010; 93(3), 783–788. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.10.023</jrn>
- 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. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Reno, Nevada, 11-14 janvier 2014. *Reproduction Fertility and Development*, 26(1):12-21. doi: 10.1071/RD13328.
- Pryce J & Daetwyler H. Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: a review of international research. *Anim. Prod. Sci.* 2012; 52: 107–114.
- Pryce J, Hayes B. A review of how dairy farmers can use and profit from genomic technologies. *Anim. Prod. Sci.* 2012; 52: 180–184
- Pryce JE, Hayes BJ, Goddard ME. Genotyping dairy females can improve the reliability of genomic selection for young bulls and heifers and provide farmers with new management tools. In “Proceedings of the 38th ICAR session, Cork”, 28 Mai–01 Juin 2012. Disponible sur : http://www.icar.org/Cork_2012/Manuscripts/Published/Pryce%202.pdf (consulté le 28/11/2013).
- Pulvery P. Dossier FGE, UNCEIA. BTIA, la Revue Française de Génétique et de Reproduction, 2012 ; 143 : 30p.
- Ren Z, Zeng H, Xu Y, Zhuang G, Deng J, Zhang C, Zhou C. Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy by multiple displacement amplification. *Fertil. Steril.* 2009; 91(2), 359–364. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.11.044
- Sargolzaei M, Vigneault C, Blondin P, Schenkel F, Chesnais J. Results from the Boviteq embryo genotyping research project. Dairy Cattle Breeding and Genetics Committee Meeting, 2012, September 18, 2012; 6 p.
- Sørensen MK, Voergaard J, Pedersen LD, Berg P, Sørensen AC. Genetic gain in dairy cattle populations is increased using sexed semen in commercial herds. *J. Anim. Breed. Genet.* 2011; 128, 267–275. doi:10.1111/j.1439-0388.2011.00924.x
- Thibier M, Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. In : Annual conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Calgary Convention Centre (Canada), 8-10 janvier 1995. *Theriogenology.* 1995;43(1):71–80.
- Tominaga K., Iwaki F, Hochi S. Conventional freezing of *in vitro*-produced and biopsied bovine blastocysts in the presence of a low concentration of glycerol and sucrose. *J Reprod Dev.* 2007;53(2):443–447.
- Treff NR, Jing S, Tao X Northrop LE, Scott RT. Single cell genome amplification technique impacts the accuracy of SNP based genotyping and copy number analyses *Mol. Hum. Reprod* 2001;17(6):335–343.
- Zhang C, Smith C. Computer simulation of marker assisted selection utilizing linkage disequilibrium. *Theor.Appl.Genet* 1992; 83: 813–820.

