

Sexage et transfert direct d'embryons bovins biopsiés et congelés en ferme dans un programme commercial

LACAZE S. (1), HUMBLLOT P. (2), PONSART C. (2)

(1) MIDATEST - domaine de Sensacq - 64230 Denguin - France

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

RESUME - Le sexage des embryons, basé sur l'amplification d'une séquence spécifique du chromosome Y par PCR suivie d'une électrophorèse est utilisé en France depuis les années 1990 (kit développé par l'UNCEIA à partir d'un brevet INRA 1987). Il est actuellement réalisé à partir d'une biopsie de cinq à dix cellules embryonnaires, dans un délai de 140 minutes. Une étude rétrospective a investigué les facteurs de variation associés au taux de gestation après transfert d'embryons (TE) biopsiés et congelés, à partir des résultats obtenus en ferme par l'équipe de TE de MIDATEST entre 2000 et 2007. Au total, 979 embryons ont été biopsiés, puis congelés dans un milieu contenant de l'éthylène glycol et du sérum de veau fœtal (40 %, n = 232, EG-SVF) entre 2000 et 2004 ou du sucrose (0,1 M, n = 747, EG-SUC) depuis 2004. Au total, 44,8 % des embryons sont de sexe femelle et 50 % de sexe mâle ; dans 5,2 % des cas, le sexe n'a pas été déterminé du fait d'une amplification insuffisante. La taille de la biopsie a été notée pour 770 embryons. Dans ce cas, le taux d'indétermination a été inversement relié au nombre de cellules de la biopsie (≤ 3 cellules (n = 83) : 14,5 %, 4 - 6 cellules (n = 432) : 2,6 %, ≥ 7 cellules (n = 255) : 0 % ; $p < 0,05$). Parmi les embryons de sexe femelle congelés, 319 ont été décongelés et mis en place par transfert direct. Les taux de gestation, connus pour 243 transferts, ont été de 47,2 %, et sont associés à la parité des receveuses (génisses (n = 205) : 51,7 % vs. vaches (n = 38) : 26,3 %, $p < 0,05$). Le protocole de congélation EG-SUC a eu tendance à améliorer le taux de gestation (EG-SUC vs. EG-SVF, +15 %, $p = 0,06$). Toutefois, ce facteur est partiellement confondu avec l'effet de l'année, les deux protocoles ayant été utilisés successivement dans le temps. Aucun effet du stade de l'embryon, du nombre de cellules prélevées par biopsie, du nombre d'embryons biopsiés par collecte, ni de l'intervalle entre la collecte et la congélation n'a été mis en évidence.

Sexing and direct transfer of bovine biopsied frozen-thawed embryos under on-farm conditions in a commercial program

LACAZE S. (1), HUMBLLOT P. (2), PONSART C. (2)

(1) MIDATEST - domaine de Sensacq - 64230 Denguin - France

SUMMARY - Embryo sexing has been used in France since the 1990's using a PCR method based on a specific Y DNA sequence (Kit developed by UNCEIA based on INRA patent 1987) followed by electrophoresis. The sampling of 5 to 10 embryo cells with a microblade leads to identify the sex of embryos within 140 min. This study describes on field results obtained with this kit by a large selection unit from the south of France (MIDATEST ET team) between January 2000 and February 2007 and the variation factors influencing pregnancy rates following transfer of biopsied frozen-thawed embryos. A total of 979 day 7 bovine embryos were biopsied and frozen using ethylene glycol plus foetal calf serum (40 %, n=232, EG-FCS) from 2000 to 2004 or sucrose (0.1 M, n=747, EG-SUC) since 2004. From those 44.8 % were females and 50 % were males (5.2 % sex undetermined due to low amplification of the autosomal sequence). The number of cells of the biopsy has been recorded for 770 embryos. The rate of absence of sex determination was inversely related to the number of cells of the biopsy (≤ 3 cells (n=83): 14.5 % ; 4-6 cells (n=432) : 2.6% ; ≥ 7 cells (n=255) : 0% ; $p < 0.05$), which averaged 5.8 ± 0.6 and ranged from 1 to 10 cells. Female embryos (n=319) were thawed and directly transferred. Significant sources of variation of pregnancy rates were analysed with a multivariate logistic regression model. Pregnancy rate (determined in 243 embryo transfers) averaged 47.2 % and was mainly influenced by parity of recipients (heifers (n=205): 51.7 % vs cows (n=38): 26.3 %, $p < 0.05$). The EG-S freezing protocol tended to increase pregnancy rates (EG-SUC vs EG-FCS, + 15 %, $p < 0.05$). However, this factor was partly confounded with a year effect, because both protocols were used successively. No significant effects of embryo stage, number of micromanipulated embryos per flush, number of cells of the biopsy and delay between flushing and freezing were observed.

INTRODUCTION

La technique de sexage des embryons utilisée en France a été élaborée par l'Institut national de la recherche agronomique (Inra), les laboratoires Mérieux et l'UNCEIA en 1990. Une biopsie (prélèvement de quelques cellules de l'embryon par micromanipulation sous microscope) est réalisée. Le sexage de la biopsie est déterminé par extraction de l'ADN de la biopsie, co-amplification d'une séquence spécifique de l'ADN du mâle et d'une séquence autosomale par PCR, détection de l'ADN amplifié par électrophorèse sur gel d'agarose et interprétation des résultats : deux bandes pour un mâle (bandes correspondant à l'amplification de la séquence mâle et de la séquence autosomale), une bande pour une femelle (séquence autosomale). Cette technique de sexage est efficace à 96 %, ce qui revient à dire que 96 % des embryons biopsiés sont sexés avec précision (tableau 1).

Tableau 1 : sexe des embryons biopsiés en ferme par trois équipes adhérentes à l'UNCEIA* entre 2000 et 2007 (source UNCEIA)

Nombre d'embryons biopsiés / collecte	% femelles (n)	% mâles (n)	% indéterminés (n)
6,1 (2371/389)	46 % (1085)	49 % (1169)	4 % (99)

* GENOE 2002-07, MIDATEST 2000-06, UCEAR 2005-07

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, Hasler *et al.*, 2002) mais celles-ci ne permettent pas de différencier les biopsies ne contenant pas suffisamment d'ADN de celles correspondant à de l'ADN femelle, ce qui peut conduire à des erreurs de résultats.

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. Les taux de gestation obtenus en ferme par les équipes adhérentes à l'UNCEIA étaient de 56 % pour les embryons frais et de 42 % avec embryons congelés en 1998 (Ponsart *et al.*, 2004). Depuis, les résultats obtenus se sont améliorés : pour les exercices 2005 et 2006, les taux de gestation ont atteint 64,9 % (205/316) pour les embryons transférés à l'état frais et 52,4 % (75/143) pour les embryons congelés (source UNCEIA).

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. Ce raccourcissement du temps de sexage a rendu plus facile l'organisation du chantier de sexage et la réalisation de transferts à l'état frais, en particulier chez les femelles de haute valeur génétique ayant présenté une forte réponse à la superovulation. Toutefois, l'utilisation combinée du sexage et de la congélation a l'avantage d'être plus souple par rapport à la mise en place des embryons. Ceci est en particulier utile dans le cadre d'effectifs limités de receveuses, comme par exemple dans le contexte Aubrac (Lacaze *et al.*, 2008). La maîtrise de la congélation des embryons biopsiés doit également faciliter le développement des méthodes de génotypage pour les embryons, nécessitant de différer le transfert des embryons jusqu'à obtention des résultats du génotypage (Le Bourhis *et al.*, 2008).

Afin d'améliorer encore les résultats obtenus après biopsie et congélation des embryons, une enquête rétrospective a eu pour objectif de décrire les résultats obtenus en ferme par l'équipe de transfert embryonnaire de MIDATEST entre janvier 2000 et février 2007 et de tester les facteurs de variation associés au taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés et congelés.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. COLLECTE DES EMBRYONS

Les embryons ont été collectés sept jours après insémination, suite à un traitement classique de superovulation : huit injections de FSH (Stimufol®, ULG, Belgique) ont été réalisées à douze heures d'intervalle, ainsi qu'une injection de 3 ml d'Estrumate® à la cinquième injection de FSH. Les donneuses ont été inséminées deux fois sur chaleurs observées. Au total, 171 sessions de collecte ont été réalisées, principalement chez des donneuses de race Aubrac (95 collectes depuis 2005) et Prim'holstein (69 collectes réparties entre 2000 et 2007). Seules sept collectes ont été réalisées dans d'autres races (Brune, Blonde d'Aquitaine).

1.2. MICROMANIPULATION DES EMBRYONS

Les embryons ont été jugés et classés selon les critères morphologiques indiqués dans la grille de l'IETS, après avoir été lavés dans dix bains consécutifs suivant les normes recommandées par l'IETS (manuel de l'IETS, 1998). Seuls les embryons de qualité 1 ont été biopsiés.

Au total, 979 embryons, du stade morula compactée au stade blastocyste épanoui ont été biopsiés par un opérateur unique sous microscope inversé, à l'aide d'un micro couteau et d'une micropipette de maintien. Une à dix cellules ont été prélevées par embryon en vue du sexage.

1.3. SEXAGE DES EMBRYONS

Les trousse de sexage utilisées ont été préparées par lots par le département R&D de l'UNCEIA, chaque lot étant testé avant commercialisation puis conservé à -20°C. Elles comprennent vingt-quatre microtubes contenant 20 µl de tampon de reprise (protéinase K, deux amorces spécifiques du chromosome Y et deux amorces témoins de l'ADN autosomal ; Brevet INRA-UNCEIA), vingt-quatre tubes témoins positifs mâles et femelle, un tube de mélange réactionnel (comprenant les nucléotides et le tampon de la polymérase) et un marqueur de poids moléculaire.

Les cellules embryonnaires prélevées ont été transférées dans un tube contenant le tampon de reprise. Chaque tube a alors été centrifugé, chauffé à 95°C pendant 10 min pour dénaturer l'ADN. Ensuite, le mélange réactionnel et la polymérase (Eurobiotaq®) ont été ajoutés, avant d'amplifier l'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La technique comprend trente répétitions des trois étapes suivantes : séparation des brins d'ADN par chauffage à 95°C, hybridation des amorces spécifiques présentes dans le milieu réactionnel à 57°C, synthèse de l'ADN entre ces deux amorces à 72°C. Après dépôt des échantillons sur un gel d'agarose et électrophorèse, les résultats ont été lus sur table UV après coloration au bromure d'ethidium.

Le sexage des cellules biopsiées a été réalisé dans les jours qui ont suivi les prélèvements après stockage à -25 C° dans la solution de reprise.

1.4. CONGELATION ET TRANSFERT DES EMBRYONS APRES DECONGELATION

Après l'étape de micromanipulation, les embryons ont été congelés dans l'éthylène glycol (EG, 1,5 molaire) associé 1) au sérum de veau fœtal (40 %, n = 232, EG-SVF) entre 2000 et 2004 ou 2) au sucrose (0,1 molaire, n = 747, EG-SUC) depuis 2004.

Parmi les embryons de sexe femelle congelés, 319 ont été décongelés selon la méthode de transfert direct (TD ; paillettes dans l'air pendant 5 à 10 s puis dans un bain marie à 25°C pendant 30 s). Les taux de gestation ont été confirmés par échographie pour 246 des 319 embryons transférés.

1.5. ANALYSE STATISTIQUE

Lors d'une première étape, les facteurs associés au nombre d'embryons biopsiés par collecte ont été étudiés. L'effet de facteurs liés à la collecte (année, race de la donneuse, nombre total de structures collectées par collecte, pourcentage d'embryons viables par collecte) a été testé par analyse de variance. Les facteurs reliés à la variable à expliquer au seuil de 0, 10 ont été inclus dans un modèle mixte d'analyse, avec la donneuse comme effet aléatoire.

Dans une deuxième étape, la même démarche a été utilisée pour étudier les effets de facteurs liés à la collecte (année, race de la donneuse, nombre total de structures collectées par collecte) et à l'embryon (stade, sexe) sur le nombre moyen de cellules prélevées par biopsie, noté chez 770 des embryons micromanipulés. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur type.

Enfin, les facteurs associés au taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés congelés au seuil de 0,10 lors de l'analyse univariée (tests du Chi²) ont été testés simultanément à l'aide d'un modèle logistique mixte (avec la donneuse comme effet aléatoire, *Cytel Softwar Corporation*,

Egret for Windows, 1999). Des paramètres reliés à la collecte (année, race de la donneuse, nombre d'embryons biopsiés par collecte), à l'embryon (stade, taille de la biopsie), à la congélation (protocole, délai entre la collecte et la congélation) et à la receveuse (parité, race) ont été testés pour les 243 embryons transférés dont le résultat de gestation était connu.

2. RESULTATS

2.1. DESCRIPTION DES EMBRYONS BIOPSIES

En moyenne, $5,8 \pm 0,3$ embryons ont été biopsiés et congelés par session de collecte (entre zéro et dix neuf embryons biopsiés par collecte), ce qui correspond à 41 % des embryons totaux collectés. Dans 25 % des collectes, seul un faible nombre de biopsies (0 à 3) a pu être réalisé (tableau 2). Ces collectes avec le sexage d'au moins un embryon ont été caractérisées par de fortes réponses à la superovulation, avec $14,2 \pm 0,3$ structures collectées (embryons et ovocytes non fécondés, tableau 2). Les nombres moyens d'embryons biopsiés congelés par collecte ont été liés au nombre total de structures collectées et à leur viabilité, sans effet significatif de la race, ni de l'année (tableau 3).

Tableau 2 : nombre moyen de structures collectées et d'embryons biopsiés congelés selon la race de la donneuse

Race	Totaux collectés		Biopsiés congelés	
	Moyenne \pm Erreur type	1 ^{er} - 3 ^{ème} quartile	Moyenne \pm Erreur type	1 ^{er} - 3 ^{ème} quartile
Aubrac	$15,1 \pm 0,9$	8 - 20	$6,1 \pm 0,4$	3 - 8
Holstein	$12,9 \pm 0,9$	8 - 17	$5,3 \pm 0,4$	3 - 7
Autres	$15,4 \pm 4,8$	8 - 19	$6,9 \pm 1,8$	3 - 9

Tableau 3 : facteurs associés au nombre moyen d'embryons biopsiés et congelés par collecte dans le modèle d'analyse mixte * de variance (171 collectes, $p < 0,01$)

Facteur	Classe	N	Moyenne estimée + erreur type
Nombre total de structures collectées	< 8	38	$2,0 \pm 0,5^{a**}$
	8 - 18	89	$4,7 \pm 0,3^b$
	> 18	44	$8,9 \pm 0,4^c$
Pourcentage d'embryons viables par collecte	< 40	35	$2,8 \pm 0,4^a$
	40 - 70	79	$6,3 \pm 0,4^b$
	> 70	57	$6,5 \pm 0,4^b$

* donneuse prise en compte comme effet aléatoire

** lettres différentes : $p < 0,05$

Les embryons ont été biopsiés majoritairement au stade de morula compactée (morula : 69,2%, jeune blastocyste : 20,4 %, blastocyste : 10,2 %).

2.2. CARACTERISTIQUES DES BIOPSIES ET RESULTATS DE SEXAGE

Parmi les 979 embryons micromanipulés, 44,8 % ont été diagnostiqués de sexe femelle et 50 % de sexe mâle ; dans 5,2 % des cas, le sexe n'a pas été déterminé du fait d'une amplification insuffisante.

Pour 770 des embryons micro-manipulés, l'opérateur a noté le nombre de cellules prélevées (en moyenne $5,8 \pm 0,06$). La taille de la biopsie a été reliée significativement au stade de l'embryon et au résultat du sexage. Les embryons de sexe non déterminé ou de stade morula correspondent aux biopsies les plus petites (tableau 4). En revanche, aucun effet de la race, de l'année ou du nombre de structures collectées n'a été observé. Afin de limiter la fréquence de résultats indéterminés, il peut donc être conseillé de réaliser des biopsies comportant quatre cellules ou plus (≤ 3 cellules

($n = 83$) : 14,5 %, 4-6 cellules ($n = 432$) : 2,6 %, ≥ 7 cellules ($n = 255$) : 0 % ; $p < 0,05$).

Tableau 4 : facteurs associés au nombre moyen de cellules prélevées par embryon dans le modèle d'analyse mixte * de variance (755 observations sans donnée manquante, $p < 0,01$)

Facteur	Classe	N	Moyenne estimée + erreur type
Résultat du sexage	femelle	346	$6,1 \pm 0,1^{a***}$
	mâle	387	$6,2 \pm 0,1^a$
	indéterminé	22	$4,3 \pm 0,4^b$
Stade de l'embryon **	M	515	$5,0 \pm 0,1^a$
	JB	154	$5,6 \pm 0,2^b$
	B	86	$6,1 \pm 0,2^b$

* donneuse prise en compte comme effet aléatoire

** M=morula, JB=jeune blastocyste, B = blastocyste (+ épanoui)

*** lettres différentes : $p < 0,05$

2.3. FACTEURS ASSOCIES AU TAUX DE GESTATION APRES TRANSFERT D'EMBRYONS BIOPSIES CONGELES

Les embryons ont été mis en place dans le congélateur en moyenne 150 ± 1 minutes après collecte (délais variant de 2 à 300 minutes). Les taux de gestation (47,2 %) ont été principalement influencés par la parité des receveuses (génisses ($n = 205$) : 51,7 % vs. vaches ($n=38$) : 26,3%, $p < 0,05$). Le protocole de congélation EG-SUC a eu tendance à améliorer le taux de gestation (EG-SUC vs. EG-SVF, +15 %, $p = 0,06$). Toutefois, ce facteur est partiellement confondu avec l'effet de l'année, les deux protocoles ayant été utilisés successivement dans le temps. Aucun effet du stade de l'embryon, du nombre de cellules prélevées par biopsie, du nombre d'embryons biopsiés par collecte, ni l'intervalle entre la collecte et la congélation n'a été mis en évidence (tableau 5).

Tableau 5 : principaux facteurs sans effet significatif sur le taux de gestation à l'étape univariée (243 embryons transférés avec résultat de gestation connu, $p > 0,05$)

Facteur	Classe	Effectif *	% gestation
Stade de l'embryon	Morula	167	47,3
	Jeune Blasto	39	48,7
	Blastocyste	16	62,5
Nombre de cellules prélevées par embryon	≤ 3	26	55,6
	3 - 7	65	47,8
	≥ 7	37	62,2
Nombre d'embryons biopsiés par collecte	≤ 5	84	47,1
	6 - 10	108	48,2
	≥ 7	51	45,1
Délai entre la collecte et la congélation	< 2 h	50	42,0
	2 - 3 h	102	47,6
	> 3 h	91	49,5

* Parmi ces 243 embryons, le stade a été noté chez 222 embryons et le nombre de cellules prélevées chez seulement 128 embryons.

Le sexe de 237 veaux nés a été vérifié à l'issue des gestations. Une seule erreur (naissance d'un mâle à la place d'une femelle) a été constatée, soit plus de 99 % d'exactitude du sexage sur biopsie (Lacaze *et al.*, 2008).

Tableau 6 : modèle logistique mixte* expliquant les taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés congelés ($n = 243$)

Facteur	Classe (effectif)	Odds ratio	p	% gestation observé
Protocole de congélation	EG-SVF (130)	1	0,06	40,8
	EG-SUC (113)	1,8		55,8
Parité de la receveuse	Génisse (205)	1	0,01	51,7
	Vache (38)	0,32		26,3

* donneuse prise en compte comme effet aléatoire

3. DISCUSSION

Cette enquête rétrospective confirme l'efficacité de la technique de sexage utilisée en France, avec 95 % des embryons biopsiés ayant été sexés de façon précise. Ces résultats sont similaires à ceux observés en France (tableau 1, Thibier et Nibart, 1995) et à l'étranger. En effet, plusieurs équipes utilisant des méthodes apparentées ont rapporté 90 à 95 % d'efficacité et 93 à 98 % d'exactitude (Roschlau, 1997, Shea, 1999, Lopes *et al.*, 2001). Toutefois, la taille de la biopsie ne doit pas être inférieure à quatre cellules, ce qui augmente les cas d'embryons de sexe indéterminé (Lacaze *et al.*, 1996) ou affecte la proportion de marqueurs identifiés dans le cas du génotypage des embryons (Le Bourhis *et al.*, 2007). Au contraire, le retrait de 10 à 20 % de la masse embryonnaire ne semble pas avoir d'effets négatifs sur les taux de gestation après transfert (Shea, 1999). En accord avec les observations récentes de Le Bourhis *et al.* (2008), une taille de cinq à dix cellules semble donc être optimale.

D'après cette enquête, les nombres d'embryons biopsiés par collecte sont principalement fonction de la réponse de la donneuse à la superovulation et de la qualité des embryons. L'organisation d'un chantier de sexage, qui est plus lourde qu'une opération de collecte classique (nécessitant la préparation de matériel spécifique et la mobilisation de deux techniciens) doit donc viser préférentiellement de « bonnes » donneuses, soit à partir d'une estimation des petits follicules en début de traitement, soit selon les résultats des collectes précédentes (Monniaux, 1983, Tamassia *et al.*, 2003). En revanche, ces résultats montrent que cette biotechnologie peut s'utiliser dans différents contextes raciaux, avec des résultats comparables en race Holstein et en race Aubrac.

Concernant les taux de gestation obtenus après transfert d'embryons biopsiés congelés, l'utilisation de génisses comme receveuses a permis d'obtenir des taux de gestation de 51 %, qui sont quasiment comparables à ceux observés pour les embryons entiers congelés en éthylène glycol (en vue du transfert direct) variant de 50,5 à 60 % selon les études (Ponsart *et al.*, 2004 pour revue). Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par d'autres équipes, avec des taux de gestation avoisinant 50 % après transfert d'embryons biopsiés congelés (Hasler *et al.*, 2002) et 47 % pour des embryons vitrifiés (Tominaga, 2004). La diminution très nette des taux de gestation associée à l'utilisation de vaches comme receveuses, déjà rapportée par Hasler *et al.* (2002) doit conduire à transférer les embryons préférentiellement chez des génisses.

Enfin, une tendance à l'amélioration des résultats de transfert a été observée avec le remplacement du sérum de veau fœtal par une faible concentration de sucrose dans le milieu de congélation. Cet effet positif d'une concentration de 0,1 molaire avait été rapporté pour des embryons entiers par Martinez *et al.* (2002). Toutefois, dans notre étude, cet effet est confondu avec l'effet année et l'amélioration observée pourrait aussi être attribuée à une meilleure technicité de l'opérateur au cours du temps.

CONCLUSION

Ces résultats rétrospectifs observés par l'équipe de TE MIDATEST montrent que la méthode de sexage associée à la congélation des embryons biopsiés est très efficace, et ce même en conditions de terrain, lorsque la biopsie réalisée comporte au moins quatre cellules. Le transfert direct des embryons biopsiés congelés a conduit à des taux de gestation comparables à ceux observés pour les embryons entiers. L'étude confirme l'intérêt d'utiliser préférentiellement des génisses comme receveuses. L'effet positif du sucrose dans le milieu de congélation reste à confirmer dans des conditions contrôlées.

Les auteurs remercient les éleveurs ayant accepté d'utiliser cette technique de sexage-congélation pour leurs embryons, les techniciens des équipes TE de COPELISO (Ludovic Richet et Dominique Di Scala) et de SORELIS (Sylvain Maunas et Didier Berthelot) ayant participé aux opérations sur le terrain, ainsi que le personnel du département R et D de l'UNCEIA qui teste les améliorations de la méthode, prépare les micromanipulateurs nécessaires à la biopsie ainsi que les trousse de sexage et divers réactifs utilisés (Cyril Gonzalez, Nadine Jeanguyot, Daniel Lebourhis, Laura Salas-Cortes).

- Bredbacka P., 1998.** *Reprod. Nutr. Dev.*, 38, 605-613
- Cytel Software Corporation, Egret for Windows, 1999.** *User Manual.* Cytel Software Corporation ed., Cambridge. 412
- Hasler J., Cardey E., Stockes J.E., Bredbacka P., 2002.** *Theriogenology*, 58, 1457-1469
- Lacaze S., Lesclaux J., Coupet J., 1996.** *Proc 12th AETE meeting* – Lyon, 156 (abstr)
- Lacaze S., Ponsart C., Di Scala D., Richet L., Valadier A., Pailhous C., Humblot P. 2008.** *Proc 24th AETE meeting* – Pau, 182 (abstr)
- Le Bourhis D., Amigues Y., Vannier A., Heyman Y., Humblot P., Vignon X. 2007.** *Proc. 23th AETE meeting* – Alghero, 192 (abstr)
- Le Bourhis D. Amigues Y., Charreaux F., Lacaze S., Tissier M., Morel A., Mervant G., Moulin B., Gonzalez C., Humblot P., 2008.** *Proc. 24th AETE meeting* – Pau, 188 (abstr)
- Lopes R.F., Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L. 2001.** *Theriogenology*, 56, 1383-1392
- Martinez A.G., Brogliatti G.M., Valcarcel A., De Las H., 2002.** *Theriogenology*, 58, 963-972
- Monniaux D., Chupin D., Saumande J., 1983.** *Theriogenology*, 19, 55-81
- Ponsart C., Marquant-Le Guienne B., Humblot P. 2004.** 11^{èmes} Renc. Rech. Rum. 8-9 décembre 2004, Paris, 361-368
- Roschlau K., Roschlau D., Roselius R., Dexne U., Michaelis U., Strehl R., 1997.** *Theriogenology*, 47, 273 (abstr)
- Shea B.F. 1999.** *Theriogenology*, 51, 841-854
- Tamassia M., Heyman Y., Lavergne Y., Richard C., Gelin V., Renard J.P., Chastant-Maillard S. 2003.** *Reproduction*, 126, 629-637
- Thibier M., Nibart M., 1995.** *Theriogenology*, 43,71-80
- Tominaga, 2004.** *J. Reprod. Dev.*, 50, 29-38