

Faculté de Médecine
Université Libre de Bruxelles

**LE CLONAGE PAR TRANSFERT
DE NOYAU DANS L'ESPECE
BOVINE**

Travail présenté en vue de l'obtention
du titre d'agrégé de l'enseignement supérieur

ECTORS F.J.

Docteur en Médecine
Chercheur IRSIA

Année 1995



Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Et tout d'abord, je voudrais remercier mes parents et ma famille, et plus particulièrement mon père qui est également mon chef de Service.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'Université Libre de Bruxelles qui m'a accueilli en son sein et plus spécialement au Professeur Leroy qui a accepté d'être le promoteur de cette thèse, il m'a été d'un grand secours pour l'achèvement de ce travail.

Je remercie également les membres du Jury, Messieurs les Professeurs Englert Y., Heyman Y., Koulischer L., Meurisse S., Millaire J., Pasteels J.L., Robin M. pour le travail qu'ils ont réalisé tout comme pour leurs précieux conseils.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux Professeurs Koulischer L. et Smith L.C. qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire et m'ont aidé pour l'analyse des résultats obtenus.

Les critiques et les conseils des Professeurs Derivaux J. et Beckers J-F. m'ont également été précieuses pour la rédaction du manuscrit, je les en remercie.

Toutes ces recherches n'auraient pas pu être réalisées sans le soutien financier de l'IRSIA (Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture); je remercie vivement son comité Directeur pour la confiance qu'il nous a toujours accordée.

Enfin, il est bien clair que je n'ai pas réalisé seul ce travail, il est le fruit de toute une équipe. Parmi les personnes qui m'ont aidé, je voudrais spécialement remercier Alain Delval pour sa patience et la qualité de son travail. Je voudrais également remercier le personnel du groupe FIVETE: Madame Thonon F. et Monsieur Lens H., de même que Benoit Remy et son équipe, ainsi que Kamel Touati pour leur contribution respective.

Ces années passées à l'Université de Liège, dans la Faculté de Médecine Vétérinaire et plus spécialement dans les Services d'Obstétrique et de Physiologie de la Reproduction m'ont offert l'occasion de multiples rencontres et échanges avec des collègues venus d'ici ou d'ailleurs. Puissent-ils ne pas m'en vouloir de ne pas les citer tous et trouver, au travers de ces quelques lignes, l'expression de toute ma reconnaissance.

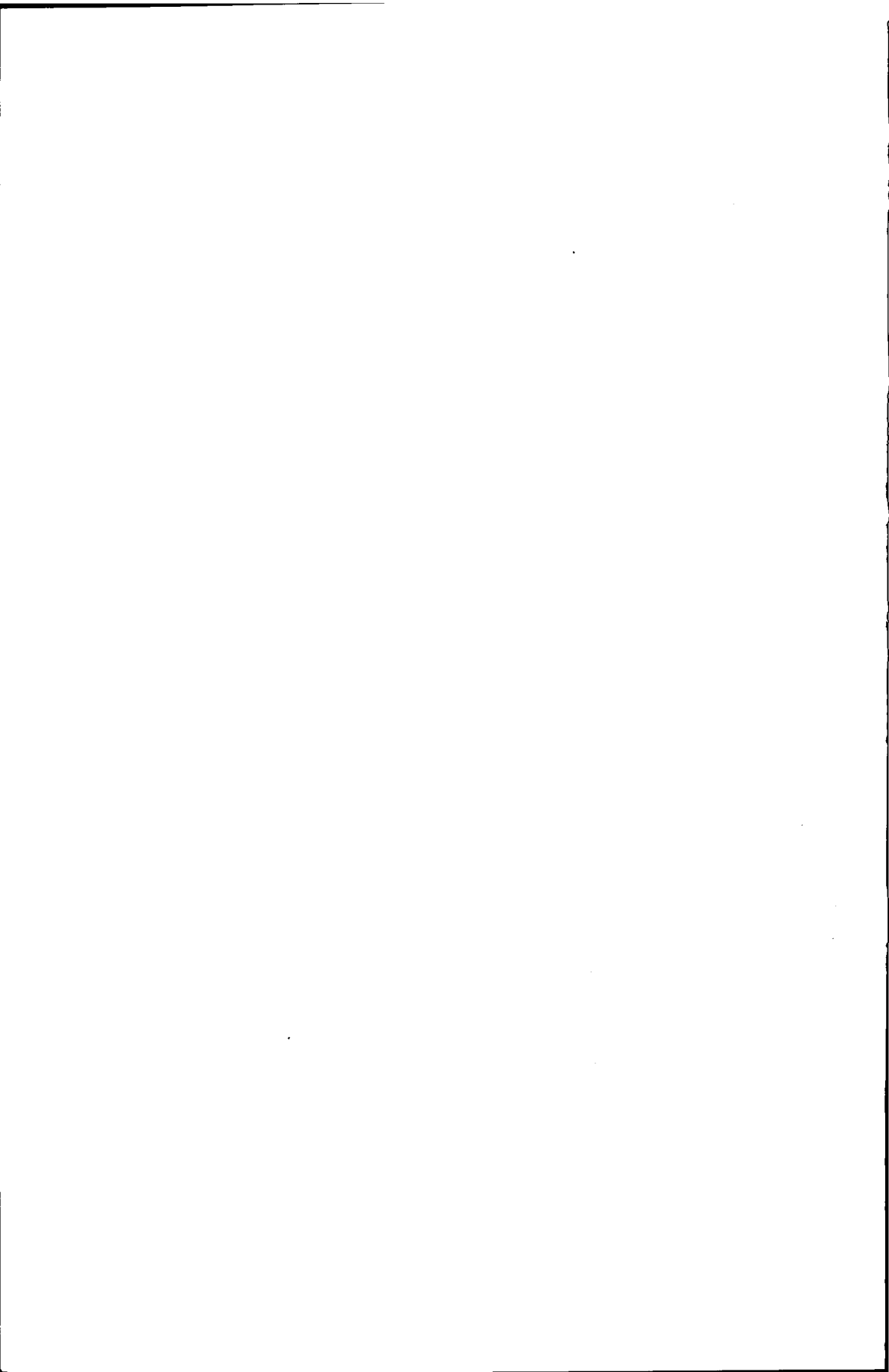
Table des matières:

1ière partie: Introduction	7
I Définition et historique du clonage	8
II Rappels physiologiques	14
III Objectifs et intérêts du travail	24
2ième partie: Matériel et méthodes	26.
3ième partie: Résultats personnels	46
I Mise au point de nos conditions de développement	47
II Réalisation du premier cycle de clonage	51
III Réalisation du deuxième cycle de clonage	59
IV Influence des conditions du transfert sur le pourcentage de gestation	63
V Contrôles des ovocytes et des embryons produits in vitro par FIV et par clonage	70
4ième partie: Discussion générale	78
Conclusions générales et perspectives	92
Résumé	99
Annexe: composition et fabrication des milieux	102
Bibliographie	114
Liste des publications	127
Articles	135

Liste des abréviations utilisées

CICR	Calcium induce calcium release
CCB	Cytochalasine B
COC	Complexe ovocyte-cumulus
FCS	Fetal calf serum
FIV	Fécondation in vitro
FSH	Follicle stimulating hormone
LH	Luteinising hormone
MC	Milieu conditionné
MIV	Maturation in vitro
MPF	Mitotic (or meiotic) promoting factor
MTOC	Microtubule organizing center
MPGF	Male pronucleus growth factor
NEBD	Nuclear enveloppe breakdown
OMI	Oocyte meiotic inhibitor
PAG	Pregnancy associated glycoprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PCC	Premature chromosome condensation
PCR	Polymerase chain reaction
TALP	Milieux de Tyrode additionnés d'albumine, lactate et pyruvate: H-TALP Hépès-TALP IVF-TALP In vitro fertilization-TALP SP-TALP Sperm-TALP
TCM-199	Tissue culture medium 199.

1: INTRODUCTION



Chapitre I:

Définition et historique du clonage

Le clonage par transfert de noyau peut se définir comme une technique de multiplication asexuée permettant de produire, à partir d'un organisme unique, un ensemble d'individus identiques possédant le même patrimoine génétique. Ce mode de reproduction existe naturellement chez les êtres unicellulaires, chez les végétaux ainsi que chez les animaux de type coloniaux tels que les hydres et les madrépores. Chez les vertébrés, la reproduction asexuée n'existe pas si l'on excepte la formation de vrais jumeaux qui peut notamment se produire par division du bouton embryonnaire, laquelle peut avoir lieu lors de l'éclosion (Massip et al, 1983).

C'est à la fin du siècle dernier que Loeb (1894) a décrit la possibilité d'obtention de deux individus identiques par bissection d'un seul œuf, l'opération a été réalisée pour la première fois chez la salamandre par Spemann qui, en 1938, a émis le principe du clonage par transfert de noyau. Partant du fait que le patrimoine génétique est contenu dans le noyau de toutes les cellules, il suffit de transférer celui-ci dans un œuf qui vient d'être fécondé et dont le noyau a été enlevé. L'œuf ainsi reconstitué et activé par la fécondation va se diviser et reproduire un individu identique au donneur. En réalisant l'opération de multiples fois à partir du même donneur, l'on obtient un clone ou un ensemble d'individus parfaitement identiques.

La réalisation technique de l'opération n'était pas facile et il a fallu attendre 1952 pour que Briggs et King réussissent le transfert de noyau chez la grenouille léopard *Rana Pipiens*. Ils ont transplanté un noyau provenant d'une blastula dans un ovocyte activé et dont le propre noyau avait été éliminé. Grâce à cette manipulation, ils ont obtenu des têtards tout à fait normaux, démontrant par là que de nombreux noyaux de blastula sont encore capables de diriger le développement d'un embryon

jusqu'à l'obtention de larves parfaitement constituées et même de grenouilles adultes et normales (Mac Kinnel, 1962).

Pour réussir le clonage chez les mammifères et obtenir un individu adulte capable de se reproduire, il faut remplacer le génome haploïde ovocytaire par le noyau diploïde contenu dans une cellule embryonnaire totipotente.

Depuis cette dernière décennie, le transfert de noyau a été réalisé chez différents mammifères et notamment chez la souris. Illmensee et Hoppe (1981) ont décrit l'obtention de blastocystes et de jeunes souriceaux après injection de noyaux provenant de cellules de l'amas cellulaire interne dans des zygotes dont les pronoyaux avaient été préalablement enlevés. Mac Grath et Solter (1983) ont infirmé les résultats précédents car ils n'ont jamais enregistré de développement après injection de karyoplastes issus de donneurs plus âgés que le stade VIII cellules.

Chez les animaux de la ferme, le clonage par transfert de noyaux est de réalisation très délicate car il implique la succession d'une série de manipulations qui doivent absolument réussir pour aboutir au résultat final. Les différentes manipulations sont schématisées dans la figure 1 et comprennent successivement: la maturation des ovocytes, leur énucléation, l'injection des blastomères du donneur, l'incorporation du blastomère dans le cytoplasme ovocytaire, l'activation de ce dernier et enfin la coculture des embryons reconstitués. A ce jour, la naissance d'animaux issus du transfert nucléaire a été obtenue pour les espèces suivantes:

- mouton par Willadsen en 1986,
- vache par Prather et al en 1987,
- lapin par Stice et Robl en 1988,
- porc par Prather et al en 1989,
- chèvre par Yong et al en 1991.

Tous ces auteurs ont utilisé des ovocytes non fécondés et énucléés comme receveurs. Actuellement, dans l'espèce bovine, la technique en est encore au stade expérimental et si quelques succès sont enregistrés de par le monde, le rendement global de l'opération est encore faible et très variable (Tableau 1).

Tableau 1: Développement des embryons bovins après transfert de noyaux:

Embryons donneurs	morula / blasto. % (Nb)	Nombre de veaux nés	Réf.
4-16 c.	12,0 (23/185)	2	Prather et al, 1987
16 c.	18,6 (92/493)	/	Westhusin et al, 1991
32-40 c.	22,0 (84/375)	/	Westhusin et al, 1991
16-64 c.	23,7 (280/1181)	92	Bondioli, 1991
16-32 c.	9,8 (10/102)	/	Clement-Sengewald et al, 1992
8-64 c.	/	101	Willadsen et al, 1991
32 c.	19,8 (19/96)	/	Heyman et al, 1992a
32 c.	16,3 (14/86)	/	Heyman et al, 1992a

D'après Renard et Heyman, 1992.

Depuis Mac Kinnel (1962), le clonage chez les amphibiens a été répété à de nombreuses reprises dans le monde et il est maintenant bien établi que la plupart des noyaux provenant d'un jeune embryon sont totipotents (Gallien, 1966; King, 1966; DiBerardino et Hoffner, 1970; Gurdon, 1974; Briggs, 1977; Mac Kinnel, 1978). Malheureusement, cette capacité au développement se restreint au cours du processus de différenciation cellulaire comme le démontrent les nombreux échecs enregistrés lors du transfert de noyaux provenant d'amphibiens adultes. Signalons toutefois que le résultat le plus performant fut l'obtention d'un têtard à partir d'une spermatogonie de grenouille *Rana Pipiens* (DiBerardino et Hoffner, 1971). Chez le Xénope, la naissance de 33 jeunes têtards a été rapportée après implantation de noyaux somatiques adultes (Laskey et Gurdon, 1970; Gurdon et al, 1975; Mac Avoy et al, 1975; Wabl et al, 1975; Brun, 1978). L'étude caryotypique a montré que la plupart de ces têtards présentaient des anomalies de nombre ou de

structure des chromosomes (Diberardino et Hoffner, 1970). Un seul était normal mais il est mort au cours de sa période larvaire précoce (Mac Avoy et al, 1975). Le pourcentage de succès de ces manipulations n'excède pas 0,3 à 6,0%, et jamais aucune grenouille adulte ne s'est développée par transfert de noyau provenant d'un individu adulte.

Chez les mammifères la situation est à peu près identique. Comme chez les amphibiens, des facteurs liés à la différenciation limitent l'utilisation des embryons donneurs. Chez la souris, Mac Grath et Solter (1984) ont montré qu'une perte du potentiel de développement survient déjà à partir du stade II. Ces résultats ont été confirmés par Robl et al, (1986), Surani et al, (1987), Tsunoda et al, (1987), Smith et al, (1988). Cette perte de la totipotence interviendrait au moment où le contrôle du développement passe sous l'influence du nouveau génome (Solter et al, 1986; Solter, 1987).

Des travaux plus récents ont quelque peu nuancé cette constatation (Tableau 2). En effet, chez le porc, espèce pour laquelle le contrôle du développement passe sous la dépendance du nouveau génome à partir du stade IV cellules (Norberg, 1973), Prather et ses collaborateurs (1989) n'ont pas détecté de différence dans le taux de développement, que les noyaux donneurs proviennent d'embryons aux stades II (9%), IV (8%) et même VIII cellules (19%) pour lesquels les résultats enregistrés sont nettement meilleurs. Chez le mouton, espèce pour laquelle le relais a lieu au stade VIII (Crosby et al, 1988), Smith et Wilmut (1989) ont montré que les noyaux provenant de stades XVI cellules (35%) ou du bouton embryonnaire (56%) sont compétents pour supporter le développement jusqu'au stade blastocyste et jusqu'à terme.

Dans l'espèce bovine, chez laquelle le relais a lieu normalement au stade VIII (Camous et al, 1986), plusieurs auteurs ont rapporté des taux de développement similaires pour des embryons donneurs du stade VIII à LXIV cellules (Tableau 2). Des recherches récentes viennent de démontrer la totipotence de certaines cellules du bouton embryonnaire du

blastocyste bovin (Keefer et al, 1994) comme cela avait déjà été observé chez le mouton. Il semble donc que pour les espèces porcine, ovine et bovine, la perte de la totipotence du noyau ne coïncide pas avec la prise du contrôle du développement par le génome de l'embryon.



Tableau 2: Synthèse bibliographique des développements pré- et post-implantatoires d'embryons reconstitués obtenus par fusion de différents types de cellules embryonnaires avec des ovocytes mûrs préalablement énucléés, chez plusieurs espèces de mammifères:

Espèces	Types de cellules embryonnaires	Nb de couples fusionnés	% de morulas & blastocystes	Nb d'embryons transférés	% de gestations établies	% de naissances	Réf.
Souris	Stade II	86	35	/	/	/	1
	Stade VIII	36	0	/	/	/	1
	BE	80	3	/	/	/	1
	BE	83	4	/	/	/	2
	CGP	135	10	59	10	0	1
Porc	Stade II	11	9	33	/	0/	3
	Stade IV	83	8	34	/	3	3
	Stade VIII	57	19	21	/	0	3
Lapin	Stade VIII	70	68	85	2	1	4
	Stade XVI	/	/	110	/	21	5
	Stade XXXII	67	76	/	/	/	5
	Stade XXXII	67	55	67	/	/	6
	Stade XXXII	91	32	207	27	4	7
	BE	52	37	/	/	/	6
	T	27	0	/	/	/	6
Mouton	Stade VIII	76	42	4	/	75	8
	Stade XVI	29	48	6	50	/	8
	Stade XVI	49	35	14	21	14	9
	BE	16	56	8	13	13	9
Bovin	Stade <VIII	111	12	12	/	0	10
	Stade <XVI	50	16	7	/	29	10
	Morula J4	95	20	/	/	/	11
	Morula J4,5	24	8	/	/	/	10
	Morula J5	604	32	/	/	/	12
	Morula J5	1148	16	/	/	/	11
	Morula J5,5	139	40	/	/	/	12
	Morula J5,5-6	/	29,4	34	30	/	13
	Morula J6	54	53	/	/	/	12
	Morula	/	/	463	23	22	12
	Morula	840	14	125	26	22	13
	BE	948	3	26	6	2	14
	Cellules ES	460	23,7	34	18,5	?	15

BE: bouton embryonnaire; CGP: cellule germinale primordiale; T: cellule trophoblastique.

Références: (1) Tsunoda et al, 1990; (2) Tsunoda et al, 1988; (3) Prather et al, 1989; (4) Tsunoda et al, 1989; (5) Collas et Robl, 1990; (6) Collas et Robl, 1991a; (7) Heyman et al, 1990; (8) Willadsen, 1986; (9) Smith et Wilmut, 1989; (10) Prather et al, 1987; (11) Stice et Keefer, 1993, (12) Bondioli et al, 1990; (13) Heyman et al, 1993; (14) Keefer et al, 1994; (15) Sims et First, 1993.

Figure 1: Schéma général du clonage. Après séparation des blastomères issus de l'embryon donneur, ceux-ci sont injectés dans l'espace périvitellin des ovocytes préalablement énucléés. La greffe du noyau donneur dans le cytoplasme ovocytaire est consécutive à la fusion de leurs membranes, fusion provoquée par une impulsion électrique. Les embryons reconstitués sont cultivés in vitro en présence de cellules tubaires (coculture). Au 5-6e jour de leur développement, l'un d'entre eux peut servir d'embryon donneur pour un deuxième cycle de clonage, tandis que les autres sont cultivés jusqu'au 7e jour en vue de leur transfert dans des receveuses synchrones.

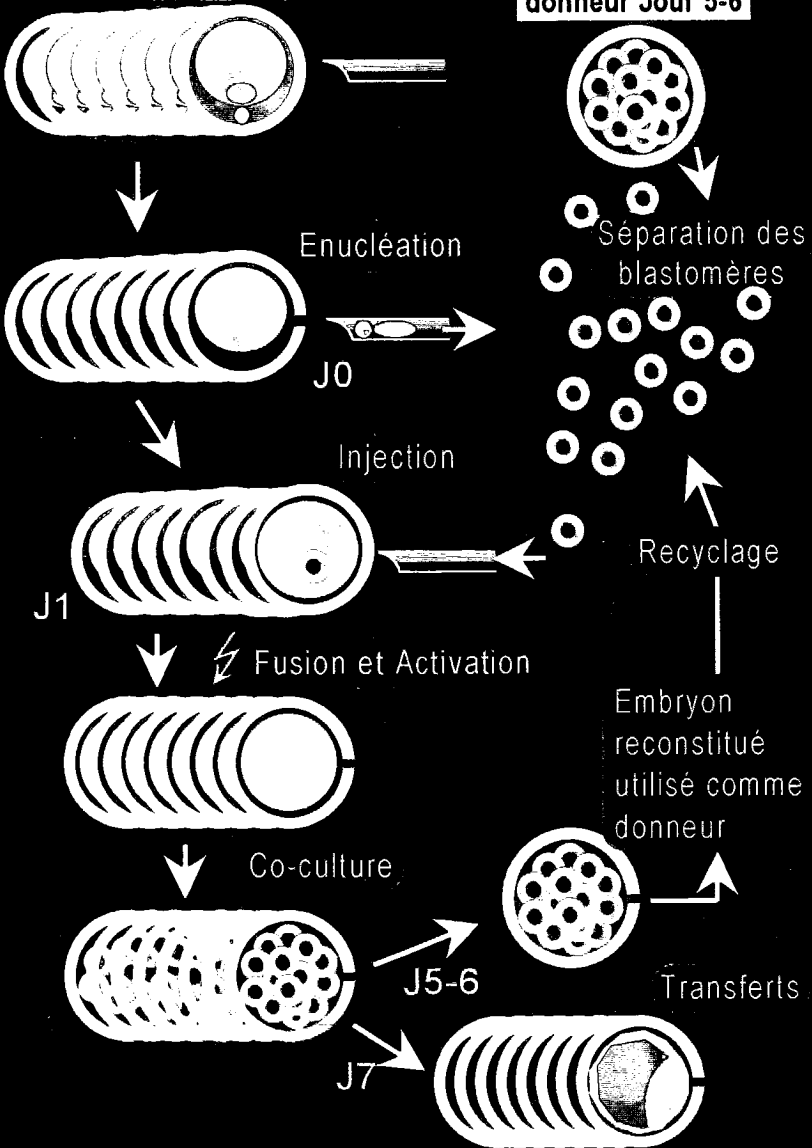
Remarque préliminaire:

Tout au long de notre travail, nous parlerons de transfert de noyau car c'est le noyau qui est porteur du patrimoine génétique et qui restaure la diploïdie de l'ovocyte énucléé, mais il doit être entendu qu'il s'agit du transfert du blastomère entier, c'est-à-dire du noyau entouré de son cytoplasme et de sa membrane plasmique.

Schéma général du clonage

Nombeux ovocytes receveurs

Un seul embryon donneur Jour 5-6



Chapitre II:

Rappels physiologiques

Pour réaliser le clonage, nous devons pouvoir disposer d'ovocytes matures utilisés comme receveurs et de jeunes morulas comme donneuses de blastomères. Les ovocytes sont prélevés par ponction de follicules de ± 1 à 12mm de diamètre. Ils sont entourés de leur cumulus oophorus et doivent subir la maturation avant d'être énucléés pour servir de cytoplasme receveur.

Avant d'entamer l'exposé de nos recherches personnelles, il convient de faire le point des connaissances actuelles sur la physiologie de la maturation ovocytaire et de son activation après fécondation ou clonage.

Maturation ovocytaire

Stockés sous forme de follicules primordiaux, les ovocytes se présentent comme de grandes cellules de $\pm 30 \mu\text{m}$ de diamètre. Au début de leur croissance, ils s'entourent d'une enveloppe, la zone pellucide, mais maintiennent des contacts étroits avec les cellules folliculaires par l'intermédiaire de prolongements que les cellules de la corona radiata envoient à travers la zone pellucide. Ces dernières sont attachées entre elles et avec la membrane de l'ovocyte par des jonctions intermédiaires de type GAP qui permettent le passage ionique de petites molécules de poids moléculaire inférieur à 1 kD.

Durant les phases de croissance, l'ovocyte va subir toute une série de modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires qui aboutiront à la formation d'un ovocyte mature apte à être fécondé.

Maturation nucléaire:

Pendant la phase de croissance, le noyau migre de sa position centrale vers la périphérie. Sa forme est sphérique et la chromatine est répartie uniformément dans l'entièreté du noyau (Figure 2b). Lors de la maturation, des ondulations apparaissent sur la portion de l'enveloppe nucléaire faisant face à la membrane cytoplasmique. Au même moment, les chromosomes commencent à se condenser tandis que le nombre de prolongements et de jonctions de type GAP entre la corona radiata et le cytoplasme ovocytaire diminuent (Figure 2c). A un stade plus avancé de la maturation, les digitations de la membrane nucléaire s'agrandissent en même temps que des points de rupture apparaissent à son niveau et que des microtubules se forment à proximité des chromosomes (Figure 2d). Une fois la membrane nucléaire disparue, les deux MTOC (microtubules organizing centers, encore appelés centrioles) apparaissent et président à la formation du fuseau (Figure 2e). Dès ce moment, la membrane cytoplasmique s'est détachée de la zone pellucide (Figure 2e). Métaphase, anaphase et télophase de la première division méiotique se succèdent rapidement pour aboutir à l'émission du 1er globule polaire (Figure 2f). Immédiatement après, les chromosomes restent à proximité de la membrane plasmique pour s'organiser en métaphase en vue de la seconde division méiotique (Figure 2g).

L'image histologique du nucléole varie en fonction de l'intensité de la synthèse des ARNs ribosomiaux. Lors de la phase d'activité maximale il est composé d'un réseau fibrillo-granulaire contenant des granules préribosomiaux et quelques centres fibrillaires. Quand la synthèse des ARNs s'estompe, le matériel protéique se condense en une masse très dense au sein de laquelle on peut distinguer deux structures lenticulaires dont le rôle est encore inconnu à ce jour.

Légende de la figure 2:

- a. et b. Ovocyte avant la maturation. Le noyau (vésicule germinative), localisé à la périphérie du cytoplasme est sphérique. L'espace périvitellin est très étroit et le contact est intime entre l'ovocyte et les digitations des cellules de la corona radiata. La chromatine est répartie dans tout le noyau.
- c. La maturation a débuté comme le révèle les ondulations de l'enveloppe nucléaire et le début de la condensation des chromosomes. L'espace périvitellin s'élargi et les contacts entre l'ovocyte et les digitations des cellules de la corona radiata disparaissent progressivement.
- d. L'enveloppe nucléaire forme de longs prolongements, alors qu'elle commence à se fragmenter en vésicules de réticulum endoplasmique lisse. A l'intérieur du noyau, on remarque une importante condensation des chromosomes et l'apparition de microtubules orientés de manière aléatoire.
- e. L'enveloppe nucléaire a complètement disparu, les deux MTOC (microtubules organizing centers) apparaissent et induisent la formation du fuseau. La métaphase de la première division méiotique s'installe. Les contacts entre l'ovocyte et les digitations des cellules de la corona radiata ont complètement disparu.
- f. Le premier globule polaire a été expulsé. Les chromosomes qui restent dans l'ovocyte sont situés dans une zone adjacente au premier globule polaire, et sont contenus dans une zone de cytoplasme plus dense traversée par des microtubules.
- g. Les chromosomes forment la métaphase de la seconde division méiotique au sein d'une zone cytoplasmique plus dense. A partir de ce moment, la maturation nucléaire de l'ovocyte entre dans une phase quiescente.

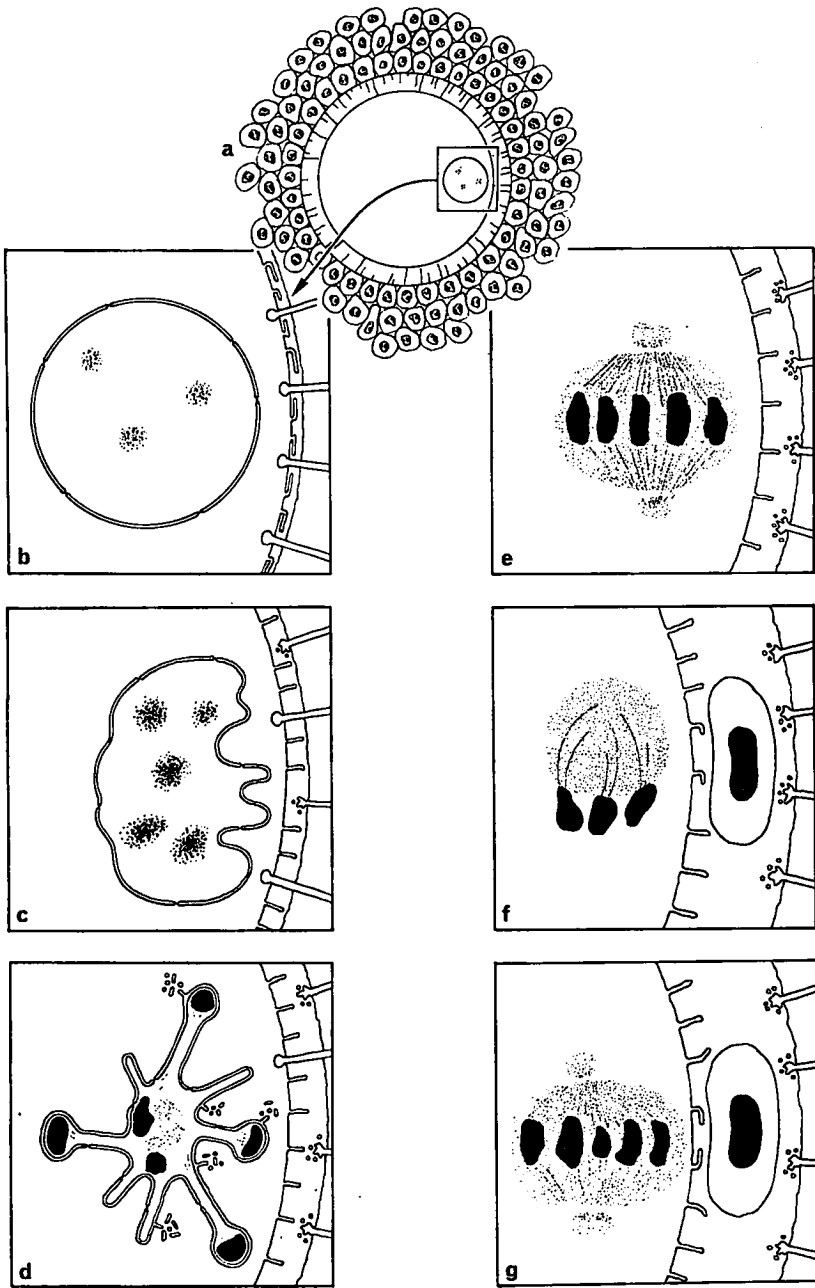


Figure 2: Schéma représentant les différentes phases de la maturation nucléaire de l'ovocyte bovin
D'après Hyttel, 1988.

Maturation cytoplasmique:

La maturation cytoplasmique est un phénomène très complexe qui s'accompagne d'une intense activité métabolique. En effet, pendant sa période de croissance, l'ovocyte synthétise tous les types d'acides ribonucléiques dont 10% sont des ARN messagers. Une partie importante de ceux-ci, appelés les transcrits maternels, sera mise en réserve pour être utilisée plus tard dans le développement de l'embryon. Cette période s'accompagne également d'une augmentation de la synthèse de très nombreuses protéines (Wassarman et Fujiwara, 1978; Kastrop et al, 1990, 1991, 1992) parmi lesquelles il faut citer les protéines de base de l'ovocyte telles que l'actine, la tubuline, la calmoduline, la lactico-deshydrogénase et les protéines qui vont constituer la zone pellucide. Le cytoplasme contient en outre toutes les molécules conditionnant le blocage, la reprise de la méiose et la décondensation du spermatozoïde, soit: l'OMI (Oocyte Meiotic Inhibitor), le MPF (Meiosis Promoting Factor) et le MPGF (Male Pronucleus Growth Factor).

C'est du déroulement normal de la maturation cytoplasmique que dépend le développement normal du futur embryon. Celui-ci doit trouver dans le cytoplasme ovocytaire, tous les éléments indispensables pour assurer les premières étapes de son développement. Il semble bien qu'une partie des échecs enregistrés lors de la réalisation in vitro des étapes de maturation, de fécondation et de développement doivent être rattachés à une maturation cytoplasmique inadéquate ou insuffisante dont on ne maîtrise qu'imparfaitement les éléments responsables.

Du point de vue des modifications histologiques, la maturation cytoplasmique se marque par la migration des granules corticaux. Formés dans l'appareil de Golgi, ils migrent vers le cortex au voisinage de points d'attache des prolongements des cellules péri-ovocytaires, où les granules corticaux sont séquestrés par petits groupes. Par la suite, ils se répartissent uniformément sous la membrane à la face interne de laquelle ils sont attachés par des brins courts de calfactine I, protéine du

cytosquelette intervenant dans l'exocytose.

Le rôle des cellules folliculaires dans la maturation cytoplasmique de l'ovocyte a été suspecté depuis longtemps au cours de la période préovulatoire (Fukui, 1990; Mochizuki et al, 1991). Rabahi et al (1991) ont démontré que le pic de LH stimule l'activité métabolique des cellules de la granulosa qui par l'intermédiaire de messagers protéiques agissent sur l'activité du complexe ovocyte-cumulus. Ces messagers transitent par le liquide folliculaire car l'addition de celui-ci au milieu de Ménézo B2 à la concentration de 10% (v/v) permet d'augmenter de manière sensible le nombre de blastocystes produits. Le fluide folliculaire agit au cours de la maturation en stimulant l'expansion du cumulus, la sécrétion de progestérone et la synthèse de protéines par le complexe ovocyte-cumulus.

Régulation de la reprise de la méiose dans les follicules préovulatoires

S'il a été décrit qu'en l'absence de gonadotropine, la maturation ovocytaire in vitro ne peut se poursuivre en présence de cellules de la granuleuse (Sirard et Bilodeau, 1990), on en est encore réduit aujourd'hui à des hypothèses quant à l'identité des facteurs responsables de ce contrôle. Parmi les facteurs inhibiteurs, il faut citer l'AMP cyclique, un ou des facteurs polypeptidiques appelés OMI, ainsi que des nucléosides puriques tels qu'hypoxanthine et adénosine. Parmi les facteurs stimulateurs, il semble bien que le MPF soit le plus important (voir revue de Parrish et al, 1992): il est constitué d'une cycline et de la protéine p34^{cdc2}. Cette dernière est un produit du gène cdc2, elle doit interagir pendant la phase G2 avec une cycline B pour former un complexe inactif, le pré-MPF (Figure 3). Cette interaction est stabilisée grâce à la phosphorylation du site 1 de la protéine p34^{cdc2} par l'enzyme CAK. L'action de cette dernière est antagonisée par une phosphatase appelée INH qui empêche l'accumulation du complexe cycline-protéine p34^{cdc2} au cours de la phase G2 du cycle cellulaire.

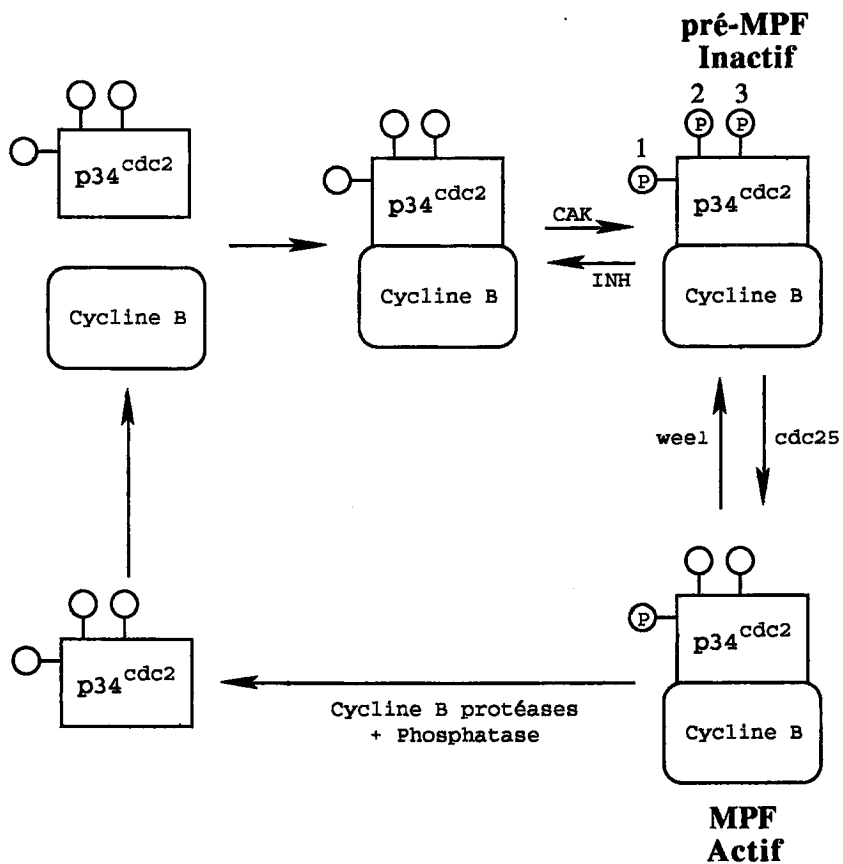
Légende de la figure 3:

La cycline B est synthétisée au cours de la phase G2, elle forme avec la protéine p34cdc², un complexe inactif, le pré-MPF. Ce complexe est stabilisé grâce à l'action de la kinase CAK dont l'effet est antagonisé par la phosphatase INH.

Le passage du complexe cycline-p34cdc² d'une forme inactive vers une forme active déclenche l'entrée de la cellule en phase M. Ce passage est le résultat d'une modification de l'équilibre entre les enzymes contrôlés par les gènes Wee1 et cdc25 et responsables de la phosphorylation et déphosphorylation du complexe.

Une fois activé, le MPF induit d'importantes réorganisations cellulaires tels que la rupture de la membrane nucléaire, la condensation des chromosomes, la formation des fuseaux mitotique ou méiotique et le partage des organites cellulaires entre les deux cellules-filles.

Au cours de la phase M, l'activité du MPF décline brutalement, ce qui permet à la cellule de poursuivre son cycle cellulaire vers l'interphase. La perte d'activité du MPF est secondaire à la destruction de la cycline.



Modifié d'après Parrish et al, 1992.

C'est de la phosphorylation et déphosphorylation (sites 2 et 3) du pré-MPF, dont le contrôle est assuré par deux enzymes antagonistes codés par les gènes *wee1* et *cdc25*, que va dépendre la transformation du pré-MPF en MPF actif. Le passage au point Entry de la phase M du cycle cellulaire, ou l'entrée en division de la cellule, dépend du rapport de concentration et/ou d'activité entre ces deux enzymes. Si le rapport augmente, la cellule ne se divise pas et sa taille augmente, par contre s'il diminue, la cellule entre en division (Murray et Kirschner, 1989). Une fois activée, la protéine $p34^{cdc2}$ du complexe MPF acquiert une activité kinasique et déclenche la disparition de la membrane nucléaire, la condensation des chromosomes, la formation du fuseau ainsi que, de manière indirecte, sa propre inactivation. Le MPF disparaît par dissociation du complexe $p34^{cdc2}$ - cycline B suite à la destruction de cette dernière tandis que la protéine $p34^{cdc2}$ est mise en réserve en vue de son utilisation lors du cycle cellulaire suivant.

Activation de l'ovocyte

La fécondation permet la création d'un nouveau génome et provoque l'activation, c'est-à-dire le démarrage de l'activité mitotique de l'œuf. La pénétration du spermatozoïde, tout en amenant l'ADN nécessaire pour restaurer la diploïdie, provoque son activation en déclenchant une augmentation transitoire du calcium libre intracellulaire.

Chez les *échinodermes*, le rôle déterminant de cette augmentation transitoire de la concentration intracellulaire en calcium a été démontré par le fait que tous les événements de la fécondation sont reproduits par l'addition d'ionophore dans le milieu de culture ou par l'injection de calcium dans l'œuf (Whittaker et Steinhart, 1982; Steinhart et Epel, 1974; Zucker et Steinhart, 1978). A l'inverse, l'injection d'EDTA, un chélateur du calcium, provoque l'arrêt de l'activation (Zucker et Steinhart, 1978). Les ions calciques représentent donc la clef du processus d'activation. En effet, la concentration en calcium libre du cytosol étant environ dix mille fois plus faible que celle du milieu extracellulaire, toute augmentation

transitoire entraîne la fixation du calcium sur les protéines du cytosol et induit des modifications de l'état de phosphorylation ou d'activité des protéines cibles. Cette action est très brève car cette augmentation du calcium est immédiatement stoppée par un mécanisme homéostatique efficace qui pompe le calcium à l'extérieur de la cellule ou dans des réservoirs internes.

Chez les *mammifères*, la fécondation déclenche un mécanisme comparable, mais beaucoup plus complexe car il met en jeu des variations périodiques du calcium. En effet chez la souris et le hamster, la fécondation déclenche une série d'oscillations de la concentration en calcium libre qui se poursuit pendant plus d'une heure après la fusion des gamètes (Cuthbertson et al, 1981; Miyazaki et al, 1986; Miyazaki, 1991; Kline et Kline, 1991). Chez le hamster, 10 secondes après la fécondation, une première libération de calcium à partir des citernes du réticulum endoplasmiques prend naissance au point de contact avec le spermatozoïde et se propage en 20-30 secondes dans toute la cellule (Miyazaki, 1991). La propagation de proche en proche de cette vague est autocatalytique et est due soit à l'action directe du calcium (calcium induce calcium release: CICR) sur la citerne adjacente (Busa et Nuccitelli, 1985), soit à l'activation localisée du calcium sur la phospholipase C qui à son tour induit la libération de calcium (Whitaker et Irvine, 1984). La deuxième et quelquefois la troisième vagues démarrent au même endroit, mais se propagent plus rapidement dans l'œuf (≈ 2 sec). Par la suite, on assiste toutes les 2 à 3 minutes, à des augmentations de calcium, non plus localisées, mais se produisant au même moment dans l'ensemble du cytoplasme. Le terme de pulsation caractérise bien ces fluctuations car la concentration en calcium passe en 2 à 3 secondes du niveau de repos c'est à dire 100 nM à 1 à 2 μ M, pour se maintenir pendant quelques dizaines de secondes à ce niveau, puis redescend rapidement à son niveau de base. La persistance de ces pulsations durant plus d'une heure après la fécondation est caractéristique des mammifères et se révèle être essentielle pour l'activation et le déclenchement des divisions cellulaires (Kline et Kline, 1991; Ozil, 1990; Vitullo et Ozil, 1992; Berridge et Galione, 1982).

Deux hypothèses prévalent actuellement pour expliquer comment le spermatozoïde parvient à déclencher pareil phénomène. L'une est basée sur la dégradation des phospholipides de la membrane (InsP3) des réservoirs calciques (Turner et al, 1986; Figure 4a), et l'autre sur une augmentation de la sensibilité du mécanisme de libération autocatalytique du calcium (CICR) par un facteur introduit par le spermatozoïde (Swann et al, 1987; Figure 4b).

La première hypothèse repose sur le parallélisme entre les événements de la fécondation et le mécanisme par lequel différentes hormones dégradent les phospholipides des cellules somatiques. Dans le cas de certaines cellules cibles (cellules pancréatiques, hépatocytes), la fixation d'une hormone est le point de départ d'une cascade de réactions comprenant l'activation d'une protéine G (GTP-binding protein: Turner et al, 1986; Rodell, 1980). Cette protéine activerait à son tour une phospholipase C qui hydrolyserait un des constituants de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 est un produit polaire qui diffuse dans le cytosol et qui, en se fixant sur un récepteur spécifique de la membrane d'un réservoir intracellulaire de calcium, contrôlerait son ouverture (Berridge et Irvine, 1989; Berridge, 1990). Dans ce cas, les oscillations seraient entretenues par un mécanisme de feed-back entre le calcium et la fixation de l'IP3 sur son récepteur. Cependant, si l'existence d'un système protéine G/IP3 a bien été démontrée dans l'ovocyte de hamster (Miyazaki, 1988; Swann et al, 1989), la présence sur l'ovocyte d'un récepteur membranaire intervenant dans un processus de ce type n'a jamais été établie.

La seconde hypothèse postule que le spermatozoïde, après la fusion membranaire, libère dans le cytoplasme de l'œuf un facteur protéique soluble de poids moléculaire élevé responsable du phénomène d'activation (Dale et al, 1985; Swann et Whittaker, 1990; Swann, 1990; Stice et Robl, 1989). Cette déduction est basée sur l'observation selon laquelle le démarrage de l'onde calcique a toujours lieu après la fusion des gamètes et

à l'endroit même de celle-ci. Des expériences plus récentes démontrent que l'injection d'un facteur protéique provenant d'un extrait de spermatozoïdes (Stice et Robl, 1989), provoque une série d'oscillations ayant des caractéristiques identiques à celles provoquées par la fécondation et pouvant persister plusieurs heures après l'injection. Ce facteur spermatique pourrait constituer un régulateur du calcium intracellulaire. L'existence d'un mécanisme CICR dans les cellules nerveuses et dans les cellules musculaires est due à un canal calcique situé dans le réticulum endoplasmique et activé par le calcium lui-même (Lai et al, 1988). La fécondation introduirait un facteur qui se fixant sur ce canal, en augmenterait sa sensibilité et provoquerait une suite ininterrompue d'ouvertures et de fermetures de ce canal.

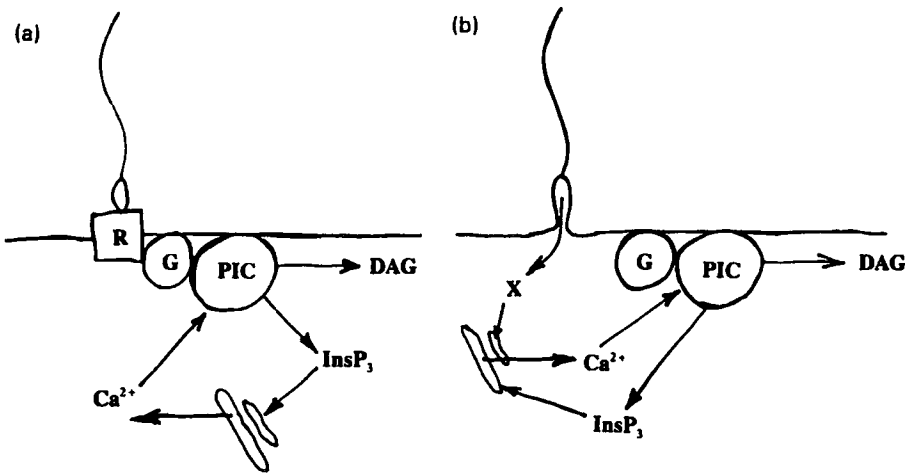


Figure 4: Schéma représentant les deux explications possibles de déclenchement de l'onde calcique par le spermatozoïde. R: récepteur membranaire, G: GTP-protéine, PIC: phospho-inositidase C, DAG:diacylglycérol, InsP₃: inositol triphosphate.

D'après Turner et al, 1986 et Swann et al, 1987.

Enfin, il faut insister sur le fait que ces variations périodiques du calcium libre constitue un processus entraîneur qui permet d'assurer la synchronisation des phénomènes biochimiques, l'exocytose des granules

corticaux, la reprise de la méiose, l'initiation de la réplication de l'ADN et enfin le déploiement du programme de développement. Il apparaît alors très clairement qu'un dérèglement ou une absence de rythme de ces oscillations calciques peut entraîner des déphasages, et être une des causes de graves perturbations du développement embryonnaire, voir provoquer la mort de l'embryon (Ozil et Swann, 1992).

Devenir du noyau transplanté dans un cytoplaste activé

La technique de transfert de noyau implique la fusion d'un seul blastomère contenant un noyau (karyoplaste) avec un cytoplaste receveur obtenu par énucléation d'un ovocyte mûr. Chez les ongulés, la fusion membranaire est obtenue par l'application d'une impulsion électrique qui provoque également l'activation de l'ovocyte énucléé.

Les modifications morphologiques que subit le noyau transféré ont été étudiées chez de nombreuses espèces telles le lapin (Collas et Robl, 1991b), le porc (Prather et al, 1990) et la vache (Kanka et al, 1991); elles peuvent se résumer comme suit: rupture de la membrane nucléaire, condensation prématurée des chromosomes (premature chromosome condensation: PCC), dispersion des nucléoles, reconstitution d'une enveloppe nucléaire et enfin gonflement du noyau pour atteindre, dans les mêmes délais, une taille similaire au pronoyau endogène (Czolowska et al, 1984). Ces transformations semblent bien être induites par un ou plusieurs facteurs présents dans le cytoplasme ovocytaire au moment de la fusion car elles ne surviennent pas, ou tout au moins dans une moindre mesure, si le noyau est transplanté dans un zygote (Barnes et al, 1987) ou dans un ovocyte déjà activé (Collas et Robl, 1991b). Le MPF pourrait en être le responsable puisqu'il déclenche le passage de la cellule en mitose et induit les transformations du noyau, la réorganisation du cytosquelette (formation du fuseau) et les changements de la morphologie cellulaire. Chez le lapin, Collas et Robl (1991b) ont montré que si le remodelage du noyau était indispensable à la reprise du développement du noyau transplanté, celle-ci était tributaire de la phase du cycle cellulaire du

noyau transplanté. En effet d'après Collas et al (1992), le plus grand pourcentage de développement est obtenu lorsque les noyaux sont transplantés en phase G1 ou au début de la phase S. Par contre, ils ont constaté d'importantes anomalies chromosomiques lorsque les noyaux étaient transplantés en fin de phase S. Celles-ci sont dues à des fragmentations de la chromatine, fragmentations sans doute secondaires à la condensation prématurée de la chromatine en cours de duplication.

Campbell et al (1993), travaillant dans l'espèce ovine, ont comparé le comportement du noyau en fonction, d'une part, du stade du cycle cellulaire durant lequel il est greffé et, d'autre part, du moment d'activation du cytoplaste receveur. Ils ont montré que l'absence de MPF est favorable au développement des embryons reconstitués. Cette absence de MPF permet le maintien d'une enveloppe nucléaire intacte, ce qui est essentiel pour le contrôle de la réplication de l'ADN. A l'inverse, tous les noyaux injectés avant la disparition du MPF dupliquent leur ADN, ce qui pour des noyaux en phases S ou G2 induit des erreurs de ploïdie. Ces auteurs sont arrivés à la conclusion que le cytoplaste receveur ne doit contenir qu'une faible quantité de MPF, ce qu'ils ont obtenu en activant l'ovocyte receveur quelques heures avant le transfert de noyau.



Chapitre III

Objectifs et intérêts du travail

Vu les intérêts scientifiques et économiques qu'une technique de clonage peut apporter à l'élevage, nous avons entrepris d'en étudier chacune des étapes pour tenter d'arriver à une production de clones d'importance suffisante pour être utilisable.

Pour des raisons tant pratiques que budgétaires, nous nous sommes, dès le départ, orientés vers le développement d'une technique de clonage où toutes les étapes sont réalisées in vitro. Dans cette optique, nous avons voulu savoir si nos conditions expérimentales de maturation, fécondation et développement in vitro étaient capables de fournir des embryons de qualité. Cette recherche fait l'objet du premier chapitre. Dans le chapitre 2, nous avons analysé l'aptitude de ces embryons à supporter le transfert de noyau. La qualité des embryons produits a été contrôlée de différentes manières: comptage de noyaux, capacité à supporter un reclonage, aptitude à induire une gestation évolutive et enfin suivi des veaux. Ces différents paramètres ont été analysés dans les chapitres 3 et 4).

La compétence à reprendre et à achever la maturation nucléaire a été analysée pour des ovocytes provenant de follicules de différentes tailles (chapitre 4). Ceci dans l'espoir de pouvoir sélectionner l'une ou l'autre catégorie de follicules aptes à fournir des ovocytes de qualité destinés à la FIV ou au clonage.

Sur le plan scientifique, le clonage s'inscrit dans l'étude de la génétique, de l'embryologie, de la physiologie de la reproduction. Il ouvre la voie à une meilleure connaissance des mécanismes régissant la maturation ovocytaire, la fécondation, la reprogrammation du noyau. Il devrait permettre de chiffrer la durée de la totipotence nucléaire, d'établir l'influence que de telles manipulations peuvent exercer sur le génome et sur la viabilité de l'embryon.

Sur le plan économique, la technique est susceptible d'intéresser les industries pharmaceutique et alimentaire en augmentant la fiabilité des études toxicologiques et pharmacodynamiques et en facilitant le testage de l'efficacité alimentaire de tel ou tel produit.

Du point de vue de l'élevage, les avantages ne sont pas négligeables et parmi ceux-ci, il faut citer: la multiplication des individus d'élite, la possibilité de remplacement rapide d'un élevage éliminé pour raisons sanitaires, l'augmentation de la précision et de l'intensité de la sélection d'un caractère d'héritabilité donnée. En effet, la précision de la sélection augmente avec la taille des clones, et cela surtout pour des caractères de faible héritabilité. En plaçant des individus identiques dans des conditions environnementales différentes, la comparaison de leurs performances permet de connaître l'influence du milieu et par là l'influence des génomes paternel et maternel. En réalisant plusieurs clones du même père mais issus de mères différentes, on dégage alors spécifiquement l'influence du génome paternel.

Le clonage permet également d'augmenter l'intensité de la sélection. En effet, si dans un programme de sélection, on choisit parmi 100 individus les 10 meilleurs, ou 10 exemplaires identiques du meilleur, on modifie très fort l'intensité de sélection qui passe de 10 à 1%. Autrement dit, la descendance sera basée sur le meilleur génome plutôt que sur l'amalgame de ce génome avec neuf autres génomes forcément moins performants. Enfin, le clonage et la FIV peuvent, dans un avenir plus ou moins rapproché, seconder des techniques telles que la superovulation, la récolte et le transfert d'embryons.

2 : MATERIEL ET METHODES



A. MATURATION DES OVOCYTES

Récolte des ovaires:

Les ovaires sont collectés indépendamment du cycle œstral et de l'état hormonal de la femelle. Dans l'heure qui suit l'abattage de l'animal, ils sont soigneusement disséqués et plongés directement dans une bouteille thermos contenant du liquide physiologique conservé à une température d'environ 30°C et additionné de 50 mg/l de kanamycine.

Transportés au laboratoire dans les 2 heures, les ovaires sont lavés par 3 ou 4 passages successifs dans du liquide physiologique à 30°C puis stockés dans un thermos à large col contenant le même liquide en attendant la ponction.

Prélèvement des ovocytes:

Cette ponction est réalisée à l'aide d'un système d'aspiration constitué d'une trompe à vide, d'un tube conique et d'une aiguille 19 G x 11/2 TWB. La dépression habituellement utilisée est de l'ordre de 10 à 20 torrs. Tous les follicules d'un diamètre compris entre 1 et 12 mm sont ponctionnés et leur contenu est recueilli dans des tubes coniques de 50 ml placés entre l'aiguille et la trompe à vide. La série de ponctions une fois terminée, les tubes sont laissés à décanter pendant 10 minutes afin d'éliminer le surnageant (liquide folliculaire).

Tri et lavage des ovocytes:

Le culot est remis en suspension dans 10 ml de TCM 199-HEPES-BSA¹. Ce lavage des complexes ovocyte-cumulus (COC) est destiné à diluer les facteurs inhibiteurs de la reprise méiotique contenus dans le liquide folliculaire. L'heure de cette mise en suspension est notée précisément car c'est le temps zéro de la maturation qui servira de

1: La composition des différents milieux se trouve en annexe à la fin du manuscrit.

référence pour toutes les manipulations faites par la suite avec ces ovocytes. Tout le contenu du tube de lavage est versé dans une grande boîte de Pétri à fond quadrillé pour examen à la loupe binoculaire.

La sélection des COC s'opère en deux temps. Le premier triage est assez grossier et seuls sont éliminés les ovocytes dénudés et ceux dont le cumulus est expansé. Les COC ainsi sélectionnés sont placés dans une boîte de Pétri contenant du TCM 199-HEPES-BSA propre et subissent un second tri pour ne retenir finalement que les COC entourés d'au moins 3 à 5 couches compactes de cellules, et dont le cytoplasme ovocytaire ne présente pas de signe de dégénérescence (Planche 1a). Ces COC sont ensuite lavés dans au moins 3 bains successifs de TCM 199-HEPES-BSA.

Maturation in vitro:

La maturation est effectuée dans des boîtes de culture à 4 puits (Nunc, réf.: 176740) contenant chacun un millilitre de liquide de maturation constitué de milieu TCM 199 additionné de 20% de sérum de vache en pro-œstrus (PECS), de 0,5 µg/ml de FSH (FSH: 75 x NIH-FSH-S1), de 5,0 µg/ml de LH (LH: 1,0 x NIH-LH-S1) et d'antibiotiques (pénicilline:100 u/ml et streptomycine: 100 µg/ml). Chaque puits reçoit 20 à 50 COC et la boîte est immédiatement mise à l'incubateur. Comme pour toutes les cultures, la température et l'atmosphère de l'incubateur sont contrôlées: 39 °C, 5% CO₂ et saturation en eau. La durée de la maturation est de 25 ± 0,5 heures (COC mûr: planche 1b).

B. FECONDATION IN VITRO

Préparation du sperme:

Une paillette (0,25ml; 20×10^6 spermatozoïdes¹) de sperme est décongelée en la plongeant pendant ± 20 secondes dans de l'eau à température ambiante. Après une dilution rapide du cryoprotecteur par vidange du contenu de la paillette dans 0,5 ml de SP-TALP, le mélange est placé sur un gradient de Percoll (3 ml de Percoll 90% surmonté de 3 ml de Percoll 45%). Une centrifugation de 15 minutes à 500 g permet d'éliminer le cryoprotecteur qui reste en tête du Percoll ainsi que les spermatozoïdes morts ou anormaux et les déchets qui se retrouvent à l'interface entre le P45 et le P90. Ne sont conservés que les spermatozoïdes normaux et mobiles qui, plus denses que le P90, se retrouvent dans le fond du tube. Afin d'éliminer les traces de Percoll, le culot est dilué dans 10 ml de SP-TALP, puis la suspension est centrifugée durant 5 minutes à 500 g. Le nouveau culot est récupéré, homogénéisé puis dilué dans l'IVF-TALP de manière à obtenir une concentration de 1×10^6 spermatozoïdes par ml. Cette concentration est déterminée à l'aide d'un hématimètre de type Neubauer à partir d'un aliquote de 10 μ l additionné de 90 μ l d'une solution hypertonique à 3% de NaCl. Chaque puits de fécondation reçoit 1 ml de la suspension de spermatozoïdes et 20 COC préalablement lavés à 3 reprises dans du milieu H-TALP.

La fécondation est réalisée à l'incubateur pendant 16 à 20 heures. Passé ce délai, les zygotes sont débarrassés des cellules du cumulus par une vigoureuse agitation (vortex: position 5) dans du milieu PBS exempt de calcium, de magnésium et de sérum. En effet, ces deux ions favorisent la cohésion des cellules, tandis que le sérum provoque

1: Paillette de 0,25 ml en chlorure de polyvinyle contenant 20×10^6 spermatozoïdes. La congélation est réalisée selon la méthode Cassou (IMV, France), après dilution du sperme par du Laiciphos 478 (milieu déposé), ajout de 7% de glycérol et de 10% de jaune d'œuf.

l'apparition de mousse lors de l'agitation et rend la récupération des zygotes difficile. Les zygotes décoronés peuvent alors être mis en développement.

C. DEVELOPPEMENT DE L'EMBRYON

I. Développement de l'embryon in vitro

a) Coculture

Récolte des oviductes:

Les oviductes sont prélevés 48 heures avant la mise en coculture des zygotes ou des clones, soit le jour même de la ponction des ovaires. Ils sont choisis sur un tractus génital sain (exempt d'adhérence et d'infection visible), provenant d'une vache normalement cyclée et présentant un corps jaune sur un des deux ovaires. Les oviductes sont ligaturés aux deux extrémités, séparés des tissus connexes et lavés deux fois dans du liquide physiologique additionné de 1 mg/l d'amphotéricine B et de 50 mg/l de kanamycine, avant d'être placés dans un tube stérile contenant le même milieu. Ce tube est conservé dans un mélange eau-glace en vue de son transport jusqu'au laboratoire.

Préparation de la suspension cellulaire:

La dissection des oviductes s'opère dans un flux laminaire en prenant soin de préserver les ligatures. Ils sont ensuite lavés dans du liquide physiologique, stérilisés en les plongeant très rapidement dans de l'alcool à 70%, puis rincés deux fois dans du liquide physiologique.

Chaque oviducte est alors étendu sur une compresse stérile. L'extrémité, côté pavillon, est coupée sous la ligature et l'ouverture ainsi obtenue est placée sur une lame porte-objet stérile. Avec une

autre lame porte-objet, l'oviducte est comprimé et raclé à partir du nœud restant, c'est-à-dire depuis la jonction utéro-tubaire. Les fragments de muqueuses sont récupérés sur la première lame et se présentent sous la forme d'un amas jaunâtre. Les cellules épithéliales sont ensuite diluées dans un premier tube de lavage, contenant 10 ml de PBS additionné de 10% de FCS (Fetal Calf Serum), de 1 µg/ml d'amphotéricine B, de 100 U/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine. La suspension cellulaire est laissée à décanter quelques minutes et le culot repris pour subir quatre lavages successifs.

Mise en culture "primaire":

Les cellules épithéliales sont mises en culture pendant 24 heures dans du milieu TCM 199 additionné de 20% de sérum de vache en pro-œstrus, de pénicilline (100 U/ml), de streptomycine (100 µg/ml) et d'amphotéricine B (1 µg/ml) en respectant le rapport suivant: 15 ml de milieu et 300 à 600 µl de suspension cellulaire. La culture est réalisée en flacons de 50 ml (Falcon, réf.:3013) maintenus à plat dans l'incubateur.

Mise en culture "secondaire": coculture avec les embryons:

Le lendemain, les cellules sont récupérées par décantation dans un tube de 15 ml puis lavées à deux reprises dans du PBS additionné de: 10% de FCS, 1 µg/ml d'amphotéricine B, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

La mise en culture secondaire est réalisée en milieu Ménézo B2 additionné de 20% de sérum de vache en pro-œstrus, de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (100 µg/ml), en respectant un rapport volume de milieu/volume de cellules situé entre 50 et 100, soit: 1 ml de milieu additionné de 20 µl de cellules. La suspension est ensuite répartie par gouttes de 50 µl dans des boîtes à quatre puits. Chaque goutte est recouverte d'approximativement 1 ml d'huile minérale et est



additionnée de 20 à 30 embryons (Planche 1d: morula en coculture).

La coculture est réalisée en cellules flottantes. Les fragments de la muqueuse tubaire maintiennent leur structure épithéliale et sont mobiles du fait de la présence de cils au pôle apical des cellules. Au cours des 7 à 10 jours que dure la coculture, la plupart des fragments conservent leur mobilité; et une partie d'entre eux s'organisent pour former des formations sphériques.

b) Préparation de milieux conditionnés

Les milieux conditionnés sont réalisés de la même manière que les cocultures, si ce n'est que les cellules sont laissées en culture primaire pendant 48 heures au minimum sans changement de milieu. Passé ce délai, les cellules sont écartées et le milieu est centrifugé à 3000 g durant 30 minutes afin d'éliminer tous les débris cellulaires. Le milieu ainsi obtenu est dit "conditionné" car il contient les produits de sécrétion nécessaires aux embryons. Il peut être utilisé immédiatement ou conservé à -20°C. Lors de la culture, il est réparti en gouttes de 50 µl recouvertes d'huile minérale, et contenant 20 à 30 embryons.

II. Développement de l'embryon chez la lapine

Après la fécondation, le développement des zygotes peut également être assuré dans l'oviducte d'une lapine pseudogestante.

La lapine est préparée, 24 ou 48 heures avant le transfert, par une injection de 150 U de Chorulon (hCG, Intervet) dans la veine périphérique de l'oreille. Elle est ensuite mise au mâle pour contrôler le bon fonctionnement de l'oviducte par l'évaluation de la qualité des embryons de lapin. Ces derniers se distinguent facilement des embryons bovins car ils sont plus volumineux et entourés d'une couche de mucine.

Planche 1:

A . Complexe ovocyte-cumulus (COC) sélectionné pour la MIV en fonction de critères morphologiques (x 40):

- cumulus dense et homogène comprenant au moins 3 à 5 couches de cellules;
- cytoplasme ovocytaire ne présentant aucun signe de dégénérescence.

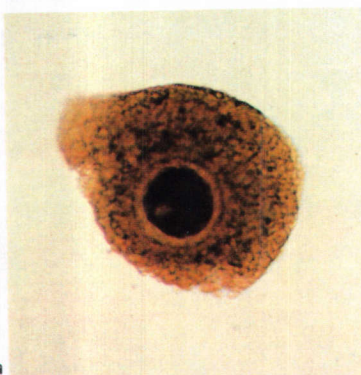
B . COC mûr, obtenu après 25 heures de MIV et présentant une large expansion des cellules du cumulus. La corona radiata est plus dense et reste toujours visible (x 40).

C . Morulas obtenues après 5 jours de développement dans l'oviducte de la lapine (x 200). Au cours de son séjour dans la trompe, la zone pellucide a été recouverte d'une couche de mucine.

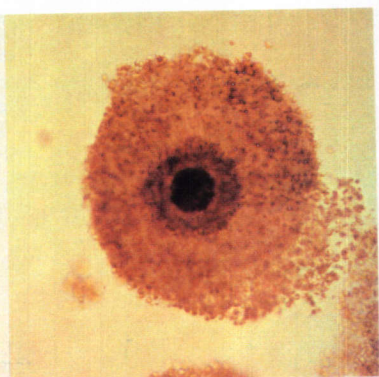
D . Morula âgée de cinq jours et développée en coculture en présence de cellules épithéliales tubaires bovines (x 200).

E . Blastocyste développé en coculture et photographié au moment de son éclosion (J10). Les cellules flottantes de la coculture ont entre-temps formé une monocouche (x 100).

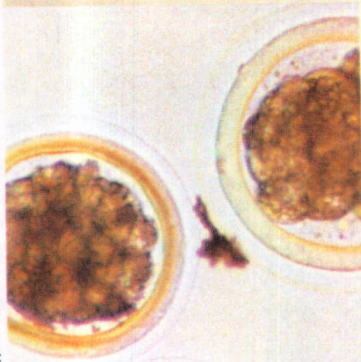
F . Blastocyste âgé de 7 jours, fixé puis coloré au Hœchst 33342. Les ±150 noyaux sont révélés sous lumière ultra-violette (x 200).



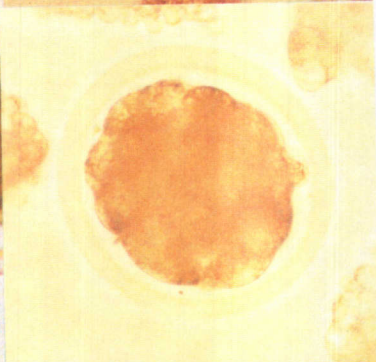
a



b



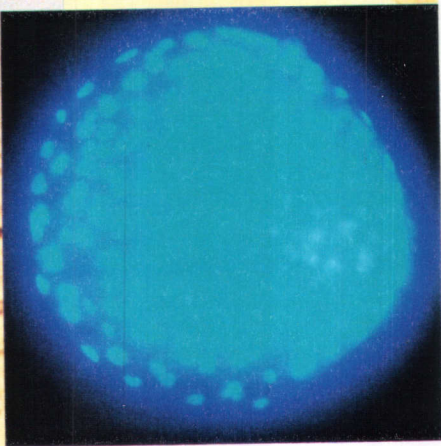
c



d



e



f

Pour réaliser le transfert, la lapine est anesthésiée à l'Hypnorm (fluanisone: 10 mg + fentanyl: 0,2 mg/ml) à la dose de 0,5 ml/kg et préparée en vue d'une laparotomie médiane. Les ovaires sont examinés pour vérifier l'ovulation, et les deux jonctions utéro-tubaires sont ligaturées pour empêcher le passage des embryons dans l'utérus.

Les zygotes à transférer sont aspirés avec un minimum de milieu dans un fin cathéter (cathéter de transfert d'embryon à usage humain; modèle de Wallace) raccordé à une seringue de 100 μ l. Le transfert est effectué via le pavillon.

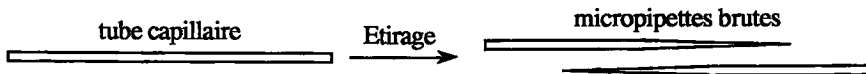
Après 5 jours, la lapine est réopérée, les oviductes sont prélevés puis rincés avec du PBS afin de récolter les embryons qui doivent avoir atteint le stade de morula ou de blastocyste (Planche 1c: morulas obtenues après 5 jours de développement dans l'oviducte de lapine).

D. CLONAGE

1. Fabrication des micropipettes:

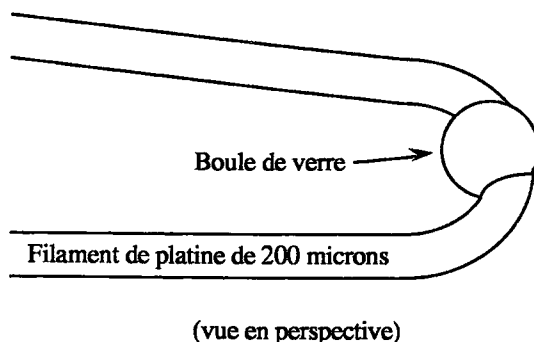
Toutes les pipettes, utilisées lors des micromanipulations, ont été fabriquées au laboratoire à partir de capillaires de marque Drummond "Microcaps" 30 microlitres (78 x 1 mm).

Ces capillaires sont étirés, à l'aide d'un appareil de marque Campden (Campden Instruments Ltd Modèle 753), qui est équipé d'un dispositif électromagnétique de traction et d'un filament chauffant se présentant sous la forme d'un ressort à boudin . Six paramètres réglables permettent d'ajuster la forme, la longueur et la finesse des pointes obtenues lors de l'étirage.

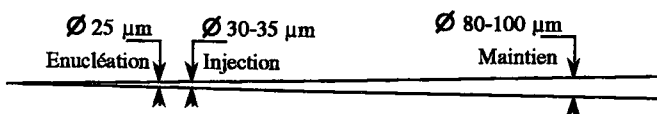


Travail à la microforge:

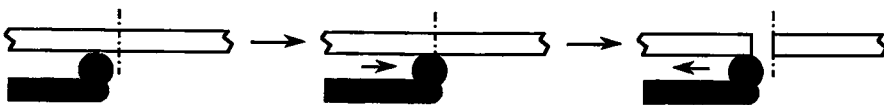
Toutes les micropipettes brutes sont ensuite traitées à l'aide d'une microforge de type "de Fontbrune" (Beaudouin modèle 4122). Celle-ci est constituée d'un élément chauffant couplé à des micromanipulateurs déplaçant le support de la micropipette, d'une source lumineuse et d'une loupe binoculaire pourvue d'un réticule gradué. L'élément chauffant est constitué d'un filament de platine (contenant 10% d'Iridium) d'un diamètre de 0,2 mm, courbé pour former une boucle assez étroite portant à son extrémité une boule de verre de 0,2 à 0,4 mm de diamètre. Cette dernière joue un rôle important lors des différentes étapes de la fabrication des micropipettes.



La première des étapes de fabrication consiste à couper la micropipette brute à un diamètre bien déterminé, suivant le travail auquel elle est destinée.



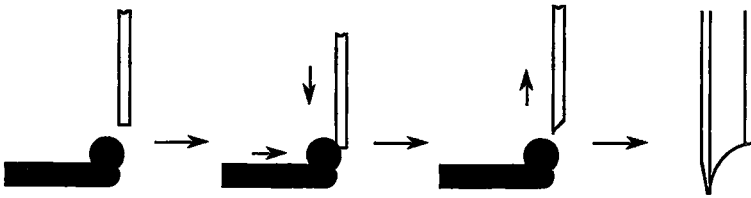
Pour ce faire, celle-ci est placée au contact de la boule de verre, parallèlement au fil de platine. Celui-ci s'allonge sous l'influence de la chaleur, faisant migrer la boule de verre qui finit par se souder au capillaire. A ce moment, le chauffage est brutalement interrompu, le refroidissement et la rétraction du filament engendrent la rupture de la pipette.



La deuxième étape consiste dans le façonnage des micropipettes ainsi obtenues qui sont, soit rodées à leur extrémité, soit effilées de manière à réaliser une pointe, ouverte ou non. Le rodage de la pipette est réalisé simplement en approchant l'élément chauffant incandescent de l'extrémité de la micropipette. La durée du rodage conditionne le diamètre de l'orifice: une pipette de maintien normale aura une ouverture de 30

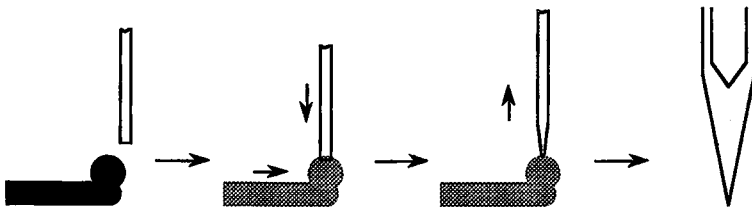
microns et une pipette de maintien destinée à la séparation des blastomères sera plus large, soit environ 50 à 60 microns.

Pour réaliser une pointe ouverte, la micropipette est amenée verticalement contre un côté de la boule de verre faiblement chauffée. Elle est relevée doucement de manière à en étirer une pointe et provoquer ainsi la formation d'un biseau.

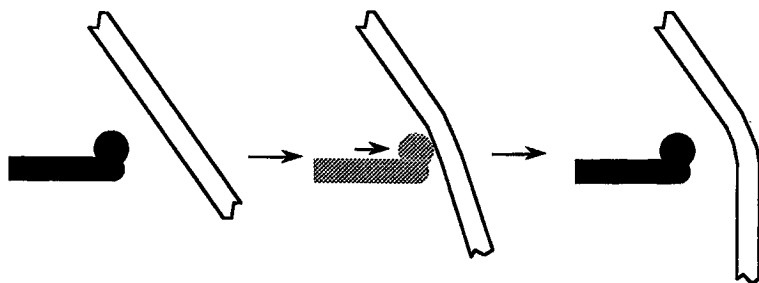


Lors de sa fabrication, la pointe est généralement trop effilée et doit être directement émoussée par un petit choc contre la boule de verre refroidie.

L'aiguille destinée à la dilacération de la zone pellucide pour l'obtention des blastomères donneurs, est réalisée à l'aide d'une micropipette coupée à 25 microns. La technique utilisée est similaire à celle du cas précédent mais le filament doit être plus chaud.



Pour tous les types de micropipette, l'état de finition se matérialise par la réalisation d'un coude, ce qui permet leur utilisation sur le fond des boîtes de Pétri sans être gêné par le bord vertical de celle-ci.



Ce coude est réalisé de la même manière qu'un rodage, en approchant l'élément chauffant incandescent d'un côté de la micropipette. Ce chauffage très ponctuel va engendrer une différence de température entre les deux cotés de la pipette qui va se courber.

2. Préparation de l'ovocyte receveur:

Elimination des cellules du cumulus:

Après 25 heures de maturation, les COC sont soumis à un traitement enzymatique (hyaluronidase: 1 mg/ml) et mécanique afin de débarrasser les ovocytes des cellules de la corona radiata qui les entourent. Le traitement à l'hyaluronidase dure 10 minutes à 39 °C, il est suivi d'une vigoureuse agitation au Vortex (position 5).

Sélection des ovocytes ayant expulsé leur premier globule polaire (1^{er}GP) :

L'expulsion du premier 1^{er}GP est, en général, le signe d'une maturation correcte ou du moins d'une maturation au-delà de la métaphase I. Seuls les ovocytes ayant expulsé leur premier 1^{er}GP sont utilisés comme ovocytes receveurs.

Enucléation des ovocytes (Planche 2a et Figure 5):

Après passage pendant ± 10 minutes dans un bain de PBS additionné de 10% de sérum et de 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de cytochalasine B (CCB: inhibiteur réversible de la polymérisation des microfilaments), tous les ovocytes présentant leur 1^{er}GP sont placés sur un couvercle de boîte de Pétri de 60mm de diamètre, dans une goutte de 150 à 300 μl du même milieu, recouverte d'huile minérale. La boîte de Pétri est placée sur le plateau d'un microscope équipé latéralement de deux blocs de micromanipulation. Le bloc de gauche supporte la pipette dite de maintien qui présente un diamètre extérieur de 110 μm et intérieur de 25 μm . Cette pipette est reliée par un fin tube en plastique à la bouche de l'opérateur qui bloque l'embryon à micromanipuler par aspiration. Le bloc de droite supporte la pipette dite d'enucléation qui présente un diamètre extérieur de 25 μm et intérieur de 10 à 20 μm et dont l'extrémité présente un biseau de ± 15 μm de long. Cette pipette d'enucléation est reliée à un système d'aspiration composé d'un microinjecteur de type Narishigé IM-5b sur lequel est adaptée une seringue en verre de 3 ml, remplie de Fluorinert.

Du fait de la forte concentration en lipides du cytoplasme ovocytaire, le noyau (la métaphase) n'est pas visible. L'enucléation est donc réalisée en aveugle. L'ovocyte à énucléer est présenté de telle manière que le globule polaire soit dans le plan de la pipette d'enucléation et situé entre 5 et 8 heures. La zone pellucide est traversée par la pipette d'enucléation de manière à aspirer le 1^{er}GP ainsi qu'environ le quart du cytoplasme ovocytaire adjacent qui, dans la majorité des cas, contient le noyau.

Contrôle de l'énucléation:

Après la micromanipulation, les ovocytes sont placés pendant 10 minutes dans un milieu constitué de PBS-10% FCS additionné de Hœchst 33342 (5 µg/ml). Ce colorant est un bisbenzimidazole qui se lie spécifiquement et de manière réversible aux bases adénine et thymine de l'ADN. Après incubation dans le Hœchst 33342, les ovocytes micromanipulés sont rincés puis placés isolément dans une microgoutte de PBS additionné de 10% de sérum et recouverte d'huile. Chaque ovocyte est alors visionné pendant 5 à 10 secondes à la lumière ultraviolette de manière à vérifier l'absence de chromosomes. L'observation se fait au grossissement 100x sous lumière ultraviolette au moyen d'un microscope équipé pour la fluorescence, (miroir dichroïque de 400nm, et des filtres de 340 à 380nm).

Les ovocytes énucléés, ou cytoplastes, retournent dans leur milieu de maturation pendant 16 ± 2 heures, moment où ils serviront de receveurs.

3. Préparation de l'embryon donneur:

Séparation des blastomères (Figure 6):

Avant de commencer la micromanipulation, le ou les embryons donneur(s) choisi(s) sont placés pendant au moins 10 minutes dans du PBS dépourvu de calcium et de magnésium mais additionné de 10% de FCS et de 7,5 µg/ml de CCB.

Tandis que l'embryon donneur est bloqué au moyen de la pipette de maintien, plusieurs fentes sont pratiquées dans la zone pellucide à l'aide d'une aiguille (diamètre de 35 µm) montée sur l'autre bloc de micromanipulation. L'amas de blastomères est ensuite sorti de la zone pellucide et disloqué par aspirations successives dans la pipette de maintien. La présence de la CCB, par son action sur le cytosquelette,

rend les blastomères beaucoup plus souples et donc beaucoup plus résistants aux micromanipulations.

4. Injection des blastomères: (Planche 2b)

La pipette de maintien est identique à celle utilisée lors de l'énucléation, tandis que la pipette d'injection présente un diamètre extérieur variant de 25 à 40 μm suivant la taille des blastomères et présente à son extrémité un biseau de 15 μm de long. Cette pipette est raccordée à un microinjecteur de type Narishigé 1M-5b rempli de fluorinert, substance inerte qui permet un meilleur contrôle de l'injection.

Quatre à six blastomères sont aspirés dans la micropipette avant d'être injectés isolément (un blastomère par ovocyte) dans l'espace périvitellin d'un cytoplaste receveur. L'injection est réalisée via le trou d'énucléation. Une fois que tous les blastomères ont été injectés, les couples cytoplaste-blastomère sont lavés dans du PBS-10%FCS avant d'être soumis à la fusion.

5. Electrofusion:

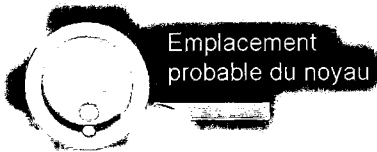
La fusion est réalisée dans une cellule conçue et réalisée par nos soins. Elle est constituée d'une boîte de Pétri au fond de laquelle est disposé une lamelle porte-objet servant de support à deux fils de platine parallèles de 100 μm de diamètre et écartés de 240 μm . La cellule d'électrofusion est connectée à un générateur d'impulsions électriques (Jouan, CHT 1287, Saint-Herblain, France) qui va fournir une onde carrée de 65 volts pendant 50 microsecondes, ce qui correspond à un champ électrique de 2,7 kVolts/cm (Figure 7 (1)).

Avant la fusion, les couples cytoplaste-blastomère sont lavés dans le milieu d'électrofusion (50 mg/ml de mannitol additionné de 0,01 mM de CaCl_2 et de 0,1 mM de MgSO_4) de manière à les débarrasser des ions

Figure 5: Enucléation de l'ovocyte. Du fait de l'abondance de lipides dans le cytoplasme, le noyau en métaphase de l'ovocyte mûr n'est pas visible, mais est normalement situé au voisinage du site d'éjection du premier globule polaire. L'enucléation est donc réalisée en aveugle, par aspiration de ce globule polaire et de la portion de cytoplasme adjacente à celui-ci.

Figure 6: Préparation des blastomères. La zone pellucide est dilacérée à l'aide d'une aiguille afin d'en extraire l'amas de blastomères. Ce dernier est ensuite disloqué par passages successifs au travers de la pipette de maintien.

Enucléation



Préparation des blastomères

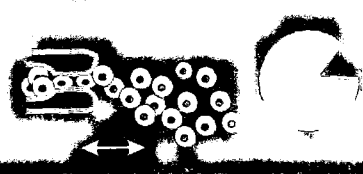
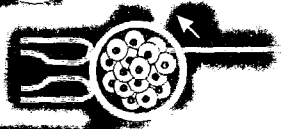
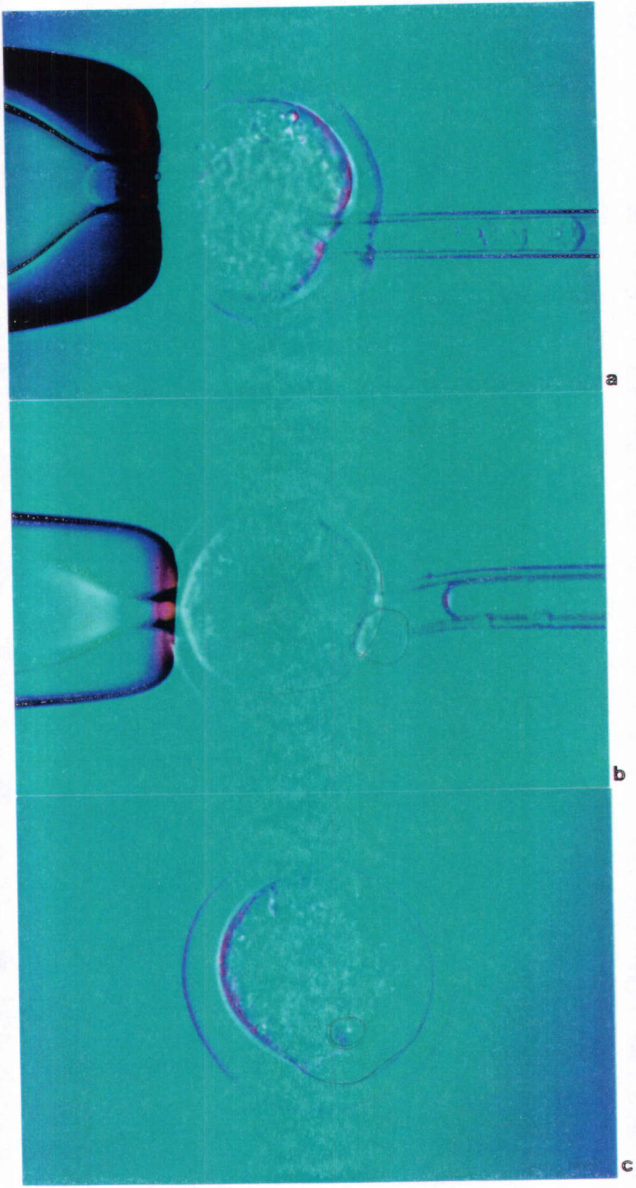


Planche 2: les trois principales étapes du clonage (x 200):

a. **énucléation:** l'ovocyte mûr est immobilisé à l'aide de la pipette de maintien, tandis que la pipette d'énucléation (diamètre extérieur de $\pm 25\mu\text{m}$) aspire le premier globule polaire et la portion adjacente de cytoplasme.

b. **injection:** un blastomère est placé dans l'espace périvitellin d'un cytoplaste (ovocyte énucléé) receveur à l'aide d'une pipette d'injection (diamètre extérieur de $\pm 35\mu\text{m}$).

c. **fusion:** suite à l'impulsion électrique, les membranes du blastomère et du cytoplaste ont fusionné ce qui entraîne l'incorporation du contenu du blastomère dans le cytoplasme ovocytaire.



contenus dans le PBS. Il est en effet indispensable que le milieu de fusion ne soit pas conducteur, auquel cas les couples cytoplaste-blastomère ne seraient pas soumis à un champ électrique mais bien à un courant qui, par son action électrolytique, entraînerait la destruction des embryons.

Chaque couple cytoplaste-blastomère est disposé isolément entre les électrodes de manière à ce que les membranes à fusionner soient disposées perpendiculairement au champ électrique (Figure 7 (2)). Ce dernier provoque l'apparition transitoire de pores au niveau de la portion des membranes située perpendiculairement à la direction du champ électrique. Si les membranes de l'ovocyte et du blastomère se touchent, comme cela doit normalement être le cas, elles se réorganisent pour ne plus former qu'une seule membrane autour des deux cytoplastes (Planche 2c). Le noyau du blastomère se retrouve alors dans le cytoplasme ovocytaire, où il subit les remaniements nucléaires nécessaires à la reprise du développement.

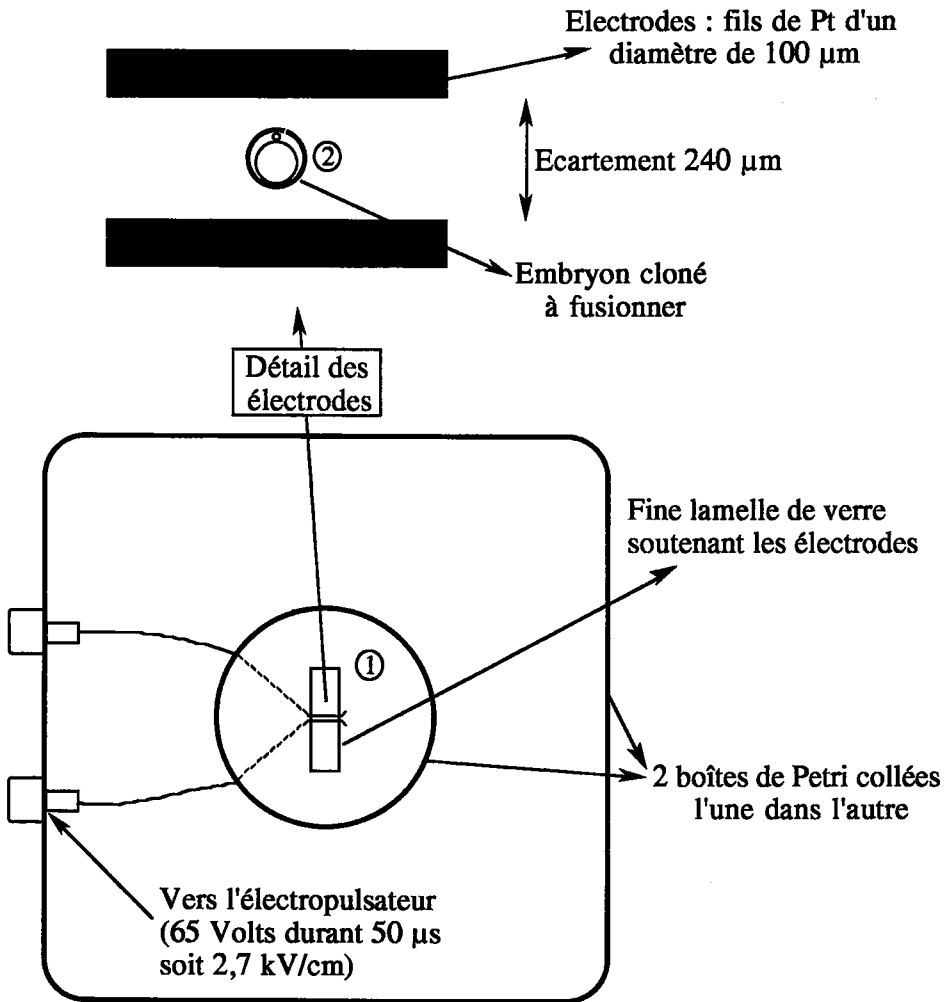


Figure 7: Cellule d'électrofusion.

6. Mise en culture des embryons reconstitués:

Dans les deux minutes qui suivent l'électrofusion, les embryons reconstitués sont placés en coculture et sont surveillés régulièrement afin de déterminer les pourcentages de fusion, de clivage, de stade 8 cellules et de blastocyste. Pour déterminer l'âge de l'embryon, nous considérons le jour de l'électrofusion comme le jour 0 correspondant à la fécondation. Au jour 6 du développement, certaines morulas peuvent être utilisées, à leur tour, comme embryons donneurs pour un second cycle de micromanipulation. Les transferts des blastocystes dans des vaches receveuses synchrones ont lieu au jour 7.

E. COMPTAGE DES NOYAUX PAR FIXATION ET COLORATION AU HÆCHST 33342

Fixation et coloration:

Le fixateur est composé d'un mélange d'éthanol et d'une solution de citrate de Na (1/3, v/v) additionné de 10 µg de colorant Hœchst 33342. Les embryons à fixer sont placés sur une lame siliconée dans un minimum de liquide et sont recouverts par une goutte de fixateur ($\pm 20\mu\text{l}$). La lame est placée à 37°C pendant 3 à 5 minutes. Après ce laps de temps, le Hœchst 33342 est éliminé, les embryons fixés sont noyés dans une goutte d'Histomount et le tout est recouvert d'une lame couvre-objet.

Les lames sont examinées à un grossissement de 100 x au moyen d'un microscope équipé pour la fluorescence, (miroir dichroïque de 400nm, et des filtres de 340 à 380nm). L'exposition à la lumière ultraviolette permet de révéler et de dénombrer les noyaux.

F. ANALYSE CARYOTYPIQUE DES OVOCYTES MATURES

A la sortie de la phase de maturation in vitro, les cellules du cumulus sont écartées par un traitement enzymatique à l'hyaluronidase et mécanique au vortex.

Préalablement à la fixation, les ovocytes sont exposés à une solution hypotonique de KCl (0,85%) pendant 5 à 10 minutes à 30°C en vue de provoquer l'étalement des chromosomes. Ils sont ensuite déposés avec un minimum de milieu sur une lame porte-objet siliconée et le fixateur (méthanol/acide acétique: 3/1; v/v) est ajouté au goutte à goutte et renouvelé à plusieurs reprises. Les lames sont mises à sécher à température ambiante puis colorées à l'orcéine avant d'être recouvertes d'une lamelle couvre-objet collée au moyen d'Histomount et examinées au microscope à immersion (x1000). Les métaphases sont analysées et classées en métaphases I ou II. Si certaines cellules ne se prêtent pas à la numération des chromosomes, leurs métaphases peuvent néanmoins être interprétées, ce qui explique que lors de la présentation des résultats, il y aura plus de noyaux en métaphases I et II que de cellules dont les chromosomes auront été dénombrés.

G. ANALYSE CARYOTYPIQUE DES BLASTOCYSTES

La méthode de fixation des blastocystes est identique à celle utilisée pour la fixation des ovocytes à deux exceptions près. Le cycle cellulaire des blastocystes n'étant pas spontanément arrêtés en métaphase, ces derniers sont cultivés en présence de 0,4 µg de colchicine (Colcemid, Gibco, réf.: 120-5210AD) pendant 2 à 3 heures avant d'être fixés. Ce poison du fuseau bloque le cycle cellulaire en métaphase et permet donc, en deux à trois heures d'exposition, d'augmenter considérablement le nombre de métaphases. La seconde différence concerne la zone pellucide qu'il faut détruire, en laissant

tomber une goutte d'acide acétique à 50%, de manière à permettre un étalement correct des chromosomes sans assister à un chevauchement des nombreuses métaphases du même embryon.

3: RESULTATS PERSONNELS



Chapitre I:

Mise au point de nos conditions de développement

Ce travail a fait l'objet d'une publication (voir article 1, pages 104 et suivantes):

Ectors F.J., Thonon F., Delval A., Fontes R.S., Touati K., Beckers J.F., Ectors F. Comparison between culture of bovine embryos in vitro versus development in rabbit oviducts and in vivo. Liv. Prod. Sci., 3 6, 29-34, 1993.

Pour réaliser le clonage, il faut non seulement pouvoir disposer d'un grand nombre d'embryons donneurs aux premiers stades de leur développement mais également être en mesure d'assurer le développement des embryons clonés jusqu'au moment de leur transfert. Après avoir mis au point nos conditions de maturation (MIV) et de fécondation in vitro (FIV) suivi du développement des embryons dans l'oviducte de lapine (Ectors F.J. et al, 1988, 1989), la première étape de notre travail a consisté dans la comparaison de cette méthode et de deux autres techniques de développement embryonnaire décrites dans la littérature à savoir: culture en présence de cellules épithéliales tubaires (Gandolfi et Moor, 1987) ou de leurs produits de sécrétion (Eyestone et First, 1989).

Les embryons issus de la maturation et de la fécondation in vitro ont donc été placés dans trois conditions différentes: soit dans l'oviducte de lapine pendant 5 jours, soit en coculture dans du milieu Ménézo B2 en présence des cellules épithéliales tubaires bovines, soit en milieu conditionné, c'est-à-dire le milieu ayant servi à la culture des cellules épithéliales tubaires et dans lequel se retrouvent leurs produits de sécrétion contenant les facteurs nécessaires au développement embryonnaire.

Résultats

A. Incidence des conditions de culture sur le pourcentage de développement.

Les résultats repris dans le tableau 3 montrent qu'il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne les taux de clivage enregistrés suite à l'utilisation de la coculture ou à l'emploi de milieux conditionnés (Ectors F.J. et al, 1993a). Par contre, le taux de blastocystes obtenu est nettement plus élevé lorsque les embryons sont développés en présence de milieux conditionnés ou dans l'oviducte de lapine. Il faut remarquer cependant que dans le cas du transfert temporaire dans l'oviducte de lapine, la perte d'embryons est considérable puisque le taux de récupération des zygotes n'est que de 66,8% (127/190). Si on ne tient compte que des embryons récupérés, le taux de blastocystes est alors de 26,0% (33/127).

Tableau 3: Développement des zygotes: en milieu conditionné (MC), coculture ou dans l'oviducte de lapine:

Modes de développement	Nb de zygotes	Embryons clivés		Embryons de VIII-cell.		Blastocystes		Nb de répétitions
		Nb	(%)	Nb	(%)	Nb	(%)	
MC	357	266	(74,5) ^a	152	(42,6) ^b	66	(18,5) ^d	5
Coculture	604	428	(71,0) ^a	185	(30,6) ^c	62	(10,3) ^e	7
Lapine	190	/	/	/	/	33	(17,4) ^{d*}	5

Dans la même colonne, la différence est significative pour les valeurs présentant des indices différents, (Chi-Carré : $p < 0.05$). *: Taux obtenu malgré un % de récupération de 66,8% (127/190), le taux de blastocystes obtenu parmi les embryons récupérés étant de 26,0% (33/127).

B. Incidence des conditions de culture sur la qualité des embryons.

La qualité du développement des blastocystes obtenus dépendant du nombre de blastomères qu'ils contiennent, nous avons procédé à la numération de ces derniers après fixation et coloration au moyen du bisbenzimidazole (Hœchst 33342). Les blastocystes produits totalement in

vivo et récoltés au 7^{ème} jour, c'est-à-dire au même stade de développement, ont été utilisés comme témoins. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau 4 et montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les embryons développés dans les oviductes de lapine ou en coculture. Par contre, les embryons produits en milieu conditionné sont constitués d'un nombre significativement plus faible de blastomères (Ectors F.J. et al, 1993 a).

Tableau 4: Comparaison du nombre moyen de noyaux obtenu en fonction du traitement:

Traitements (n)	Moyenne ± DS	Valeurs extrêmes	Nombres relatifs de noyaux exprimés en %
In vivo (6)	107,33 ± 28,22	70-145	100,0
Lapine (13)	100,15 ± 31,50	66-165	93,3
Cocult. (24)	90,83 ± 31,34	43-158	84,6
MC (24)	72,29 ± 27,98*	41-160	67,3

* Significatif par t-test (p<0.05).

Il est à noter que les résultats de la technique de la coculture sont allés en s'améliorant au fur et à mesure de la poursuite de nos travaux, en raison d'une plus grande rigueur dans le choix des oviductes recueillis et d'une meilleure expérience de la technique (Tableau 5).

Tableau 5: Développement des zygotes en coculture (résultats actuels).

	Nb de zygotes	Embryons clivés		Embryons de VIII-cell.		Blastocystes	
		Nb	%	Nb	%	Nb	%
Coculture	596	492	(82,5)	336	(56,4)	163	(27,3)

L'appréciation de la qualité des embryons produits en coculture est soumise à deux critères: nombre des noyaux au septième jour du développement (Tableau 6; Planche 1f) et détermination du pourcentage d'embryons éclos au dixième jour de la coculture (Tableau 7; Planche 1e).

Tableau 6: Nombre moyen de noyaux constituant les blastocystes obtenus en coculture:

(n)	Moyenne ± DS	Valeurs extrêmes
(48)	105,15 ± 22,2	69 à 148

Tableau 7: Nombre de blastocystes éclos obtenus en coculture (5 essais):

% de Blast.	% de Blast. éclos	Blast. éclos / Blast.(%)
29,2	15,7	53,7
190/650	102/650	102/190

Un petit nombre de ces embryons ont été transférés chez des receveuses synchrones et nous avons enregistré la naissance d'un veau (Planche 3a) à partir d'embryons produits en coculture et cryopréservés selon la méthode de Touati K. et Ectors F. (1991) en vue du transfert direct.

Chapitre II:

Réalisation du premier cycle de clonage

A) Détermination des paramètres de l'électrofusion et de l'activation:

Dans un premier temps, des ovocytes mûrs, ayant expulsé leur premier globule polaire, et n'ayant subi aucune micromanipulation, ont été soumis à des impulsions électriques de tension variable mais de durée fixe de 50µsec afin de déterminer le voltage maximal que peut supporter un ovocyte. En effet, d'après les expériences de Collas (1989) chez le lapin, il apparaît que l'activation ovocytaire ne se produit que suite à des décharges électriques de tension supérieure à celle nécessaire à la fusion et légèrement inférieure à la valeur létale.

Etant donné que les étapes de l'énucléation des ovocytes et de l'injection du blastomère durent approximativement 2,5 heures, nous avons utilisé pour notre expérience des ovocytes ayant subi 27,5 heures de MIV. Après élimination des cellules du cumulus et de la corona radiata, les ovocytes, répartis en différents groupes, sont traités par une impulsion électrique de 50µsec et d'intensité décroissante selon les groupes. Ils sont ensuite remis en culture pendant 3 heures avant d'être fixés dans un mélange de méthanol/acide acétique (3:1, v/v) et colorés à l'orcéine dans le but de vérifier l'activation (Tableau 8). Sont considérés comme activés, tous les ovocytes ne présentant plus de métaphase II et ayant commencé leur évolution vers la formation d'un pronoyau.

Tableau 8: Comparaison, après fixation, des taux d'ovocytes en métaphase II, activés ou lysés après une impulsion de 50 microsecondes.

Tensions de l'impulsion*	Nb d'ovocytes	Méta II (%)	Activés (%)	Lysés (%)
130 V	14	0 (0%)	0 (0%) ^a	14 (100%)
110 V	16	0 (0%)	1 (6,3%) ^a	15 (93,7%)
90 V	12	1 (8,4%)	2 (16,6%) ^a	9 (75,0%)
70 V	13	0 (0%)	9 (69,2%) ^b	4 (30,8%)
60 V	17	1 (5,9%)	12 (70,6%) ^b	4 (23,5%)
50 V	25	1 (4,0%)	20 (80,0%) ^b	4 (16,0%)
40 V	10	3 (30,0%)	6 (60,0%) ^b	1 (10,0%)
0 V	14	14 (100%)	0 (0%) ^a	0 (0%)

*: Voltage mesuré aux bornes de la cellule d'électrofusion.

a, b: les valeurs avec des exposants différents sont significativement différentes.

La diminution de la tension va de pair avec une diminution du pourcentage d'ovocytes lysés. L'activation maximale étant obtenue pour une stimulation de 50 Volts, nous avons choisi, pour les manipulations suivantes, une tension de 65 Volts qui correspond à un champ électrique de 2,7 KVolts/cm (l'espace entre les deux électrodes étant de 0,024 cm) de manière à nous rapprocher du seuil létal favorable à l'activation (Collas, 1989).

L'efficacité de ce traitement activateur fut contrôlé par la mise en culture des ovocytes mûrs non micromanipulés et ayant subi une activation parthénogénétique de 65 Volts pendant 50 µsec. Pour faciliter le développement parthénogénétique, il est souhaitable de conserver à l'ovocyte un génome diploïde (Tarkowski et Rossant, 1976), si bien que nous avons provoqué la rétention du second globule polaire en cultivant les ovocytes dans du milieu TCM 199 additionné de 7,5 µg/ml de CCB (cytochalasine B) pendant 4 heures à partir de l'électrofusion. Passé ce délai, les ovocytes ont été cultivés de manière classique en coculture dans du milieu B2 de Ménézo (Tableau 9). Ce procédé nous permet de contrôler l'efficacité du traitement activateur sur la capacité au développement de l'ovocyte sans qu'il soit influencé par un noyau

étranger.

Tableau 9: Taux d'ovocytes lysés et de développement parthénogénétique induit par une impulsion activatrice de 65 Volts et de 50 µsec après 27,5 heures de MIV.

Taux de lyse	Taux de clivage	Taux de stade VIII	Taux de morula/blast.
18,0% (11/61)	50,0% (25/50)	16,0% (8/50)	6,0% (3/50)

Une impulsion activatrice de 65 Volts et de 50 µsec est donc efficace pour activer 50% (25/50) des ovocytes: nous l'avons retenue pour la poursuite de nos travaux.

B) Mise au point des différentes étapes de micromanipulation:

Pour des raisons de facilité et d'économie, nous avons débuté nos micromanipulations en utilisant des embryons produits in vitro comme donneurs de blastomères (Tableau 10). Cette façon de procéder nous a permis de mettre au point, à la fois, le contrôle de l'énucléation et la fabrication des instruments nécessaires à la micromanipulation.

Au départ, tous les ovocytes micromanipulés recevaient un blastomère et le contrôle de la proportion d'ovocytes réellement énucléés était obtenu par fixation et coloration à l'orcéine d'un échantillon. Nous avons ainsi pu déterminer que l'énucléation n'était réelle que dans 71,2% des cas (Tableau 10). Pour la suite de notre travail, nous avons décidé de contrôler l'énucléation grâce à l'utilisation du colorant Hœchst 33342. Celui-ci, révélé sous illumination ultraviolette, marque tous les ovocytes incorrectement énucléés qui sont éliminés immédiatement.

Tableau 10: Premiers résultats des micromanipulations réalisées à partir d'embryons donneurs produits in vitro.

Taux de:	%	Nb
-Enucléation*:	71,2	235/330
-Clivage:	9,4	22/235
-Stade VIII:	3,4	8/235
-Blastocyste:	1,7	4/235

* Le contrôle de celle-ci a été réalisé par fixation et coloration à l'orcéine d'un échantillon.

A ce stade de l'expérimentation, les protocoles d'enucléation et d'électrofusion étaient établis mais les taux de développement des embryons reconstitués restaient très faibles (Tableau 10). Nous avons alors envisagé de dissocier les étapes d'enucléation et d'injection de manière à laisser vieillir les ovocytes après enucléation. Pour déterminer la durée optimale du vieillissement, nous avons décidé de comparer les taux de développement parthénogénétique de plusieurs groupes d'ovocytes activés à des moments différents de leur MIV, soit des ovocytes âgés de 25, 34, 44 et 54 heures. Ce protocole expérimental a été choisi de manière à pouvoir se calquer, dans la mesure du possible, sur l'horaire du travail du laboratoire: 44 heures correspondent au matin du deuxième jour qui suit le début de la MIV, 25 heures correspondant au groupe témoin (Tableau 11).

L'efficacité du traitement activateur augmente avec l'âge de l'ovocyte, soit de 25 à 44 heures, passé ce délai une chute importante des taux de développement est observée.

A ce stade de la recherche, notre protocole expérimental peut donc s'établir comme suit: les ovocytes sont sélectionnés en fonction de la présence de leur premier globule polaire après 24 heures de MIV car c'est à ce moment que le premier globule polaire est bien visible et n'a pas encore eu le temps de dégénérer et de disparaître. Immédiatement après cette sélection, l'enucléation est réalisée et vérifiée, seuls les cytoplastes (ovocytes réellement enucléés) sont replacés dans leur milieu de

maturation jusqu'au lendemain; cette période de vieillissement les rendant plus sensibles au stimulus activateur. L'électrofusion-activation est réalisée à 44±2 heures après le début de la maturation (T0).

Tableau 11: Comparaison des taux de développement parthénogénétique d'ovocytes activés après différentes durées de MIV

Durée de la MIV	Taux de clivage	Taux de stade VIII	Taux de morula/blastocyste	Nb d'essais
25h	23,4% (26/111)	7,2% (8/111)	2,7% (3/111)	2
34h	30,2% (13/43)	7,0% (3/43)	4,7% (2/43)	1
44h	38,8% (54/139)	12,9% (18/139)	9,4% (13/139)	3
54h	33,9% (37/109)*	13,8% (15/109)*	0% (0/109)	2

*: beaucoup de clivages sont totalement anormaux.

C) Comparaison de trois catégories d'embryons donneurs:

Ce travail a fait l'objet d'une publication (voir article 2, pages 104 et suivantes):

Ectors F.J., Delval A., Touati K., Thonon F., Beckers J.F., Ectors F. Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine: premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 137, 427-431, 1993.

Pour cette étude, nous avons utilisé comme embryons donneurs, des morulas âgées de 5,5 jours, constituées de ±32 blastomères, et produites soit in vivo et utilisées immédiatement ou après cryopréservation, soit produites in vitro et utilisées directement, c'est-à-dire sans congélation préalable (Ectors F.J. et al, 1993 b, c). Nous avons appliqué le protocole expérimental que nous venons de définir.

Le pourcentage d'énucléation des différents lots d'ovocytes ayant servi à l'expérimentation est de 69,9%, soit 808 ovocytes énucléés sur un total de 1156.

Le nombre moyen d'embryons reconstitués obtenus par embryon donneur (un embryon reconstitué est un ovocyte énucléé ayant reçu un blastomère et ayant subi l'électrofusion) est de: 27,7 pour les donneurs produits in vivo et utilisés frais, 15,2 pour les mêmes embryons ayant subi la congélation, et 19,1 pour les embryons produits in vitro et n'ayant pas subi la congélation (Tableau 12 a,b,c). Ces résultats démontrent que les embryons donneurs produits in vivo et utilisés à frais fournissent un beaucoup plus grand nombre de blastomères utilisables (27,7) que les deux autres catégories, et particulièrement que les embryons congelés (15,2).

Tableau 12 a: Résultats de 14 manipulations de clonage réalisées à partir d'embryons donneurs produits in vivo et non congelés¹:

Nb moyen de reconstitués / Nb d'embryons donneurs:	27,7 (388 / 14)	
Moyennes des pourcentages de:	% extrêmes:	
-Clivage:	65,2 ± 14,7	26,3 - 84,6
-Stade VIII:	21,5 ± 10,9	7,9 - 39,5
-Blastocyste:	13,1 ± 7,2	4,2 - 28,6
Rendement global (n=14):	12,9% (50 / 388)	
	(Nb blastocystes / Nb de reconstitués)	

1: un donneur par manipulation

Tableau 12 b: Résultats de 9 manipulations de clonage réalisées à partir d'embryons donneurs produits in vivo et congelés¹:

Nb moyen de reconstitués / Nb d'embryons donneurs:	15,2 (137 / 9)	
Moyennes des pourcentages de:	% extrêmes:	
-Clivage:	49,5 ± 9,1	30,8 - 65,0
-Stade VIII:	16,1 ± 12,0	0,0 - 30,8
-Blastocyste:	2,2 ± 3,5	0,0 - 7,7
Rendement global (n=9):	2,2% (3 / 137)	
	(Nb blastocystes / Nb de reconstitués)	

1: un donneur par manipulation

Tableau 12 c: Résultats de 13 manipulations de clonage réalisées à partir d'embryons donneurs produits *in vitro* et non congelés¹:

Nb moyen de reconstitués / Nb d'embryons donneurs:	19,1 (248 / 13)	
Moyennes des pourcentages de:	% extrêmes:	
-Clivage:	68,7 ± 14,7	34,8 - 83,3
-Stade VIII:	21,6 ± 15,5	0,0 - 40,9
-Blastocyste:	11,5 ± 9,9	0,0 - 27,3
Rendement global (n=13):	12,9% (32 / 248)	
	(Nb blastocystes / Nb de reconstitués)	

1: un donneur par manipulation

Tableau 12 d: Comparaison des nombres de blastocystes obtenus en fonction du type de donneurs: *in vivo* - *in vivo* congelé - *in vitro*:

	Nb	Chi ²
-In vivo et non congelé:	50 / 388	<i>in vivo</i> - <i>in vivo</i> congelé: p < 0,001
-In vivo et congelé:	3 / 137	<i>in vitro</i> - <i>in vivo</i> congelé: p < 0,001
-In vitro et non congelé:	32 / 248	<i>in vivo</i> - <i>in vitro</i> : NS

D) Résultats des transferts en fonction des différentes catégories d'embryons donneurs:

Les blastocystes obtenus par clonage, à partir de blastomères issus des différentes catégories d'embryons donneurs, ont été transférés dans des receveuses au septième jour de leur développement (Ectors F.J. et al, 1993c).

L'utilisation de donneurs produits *in vivo* et employés à frais a permis d'obtenir le développement de 12,9% de blastocystes (50/388). De ceux-ci, 35 ont été transférés dans 19 receveuses synchrones dont 6 sont arrivées au terme de leur gestation et ont donné naissance à 7 veaux (une gestation gémellaire), ce qui correspond à 31,6% des animaux transférés ou à 20,0% de veaux par rapport au nombre de blastocystes (Tableau 13; Planche 3b).

L'utilisation de blastomères provenant d'embryons produits *in vivo* et employés après congélation n'a malheureusement donné lieu qu'à un très faible taux de développement, et le transfert du seul blastocyste obtenu s'est soldé par un échec. Ces médiocres résultats sont plus que probablement à attribuer à la fragilisation des membranes induite par la congélation.

Tableau 13: Résultats des transferts d'embryons produits à partir de donneurs produits *in vivo* et utilisés à frais:

Taux de receveuses positives à: par rapport au nombre de:	21 J	90 J	Terme
Receveuses transférées:	73,7 (14/19)	31,6 (6/19)	31,6 (6/19)
Embryons transférés:			20,0 (7/35)

L'utilisation de blastomères provenant d'embryons produits par MIV/FIV et culture *in vitro* et utilisés sans cryopréservation préalable a donné lieu à une production de blastocystes reconstitués légèrement inférieure à celle enregistrée lors de l'emploi de blastomères produits *in vivo* et utilisés à frais (11,5% versus 13,1%, cfr tableau 12). Peu d'entre eux ont été transférés, néanmoins les blastocystes obtenus sont viables puisque sur 4 transferts portant sur 7 embryons obtenus, nous avons obtenu la mise bas d'un veau normal.

Ces résultats sont importants car ils démontrent la possibilité d'utiliser les embryons produits *in vitro* comme donneurs pour le clonage et le reclonage.

Chapitre III:

Réalisation du deuxième cycle de clonage, ou reclonage

Résultats présentés dans l'article suivant (voir article 3, pages 104 et suivantes):

F.J. Ectors, A. Delval, L.C. Smith, K. Touati, B. Remy, J-F. Beckers, F. Ectors. Development potential of reconstructed bovine embryos produced in first and second cycle of nuclear transfer. Accepté dans *Theriogenology*.

Si, à ce jour, une partie des problèmes techniques rencontrés au cours des différentes étapes du clonage ont été résolus, notamment ceux liés aux micromanipulations et à la fusion, par contre le taux de développement des embryons reconstitués est encore loin d'être idéal malgré les nombreuses recherches effectuées à ce jour. Pour contourner ce problème nous avons choisi d'accroître l'efficacité du clonage en augmentant le nombre d'embryons reconstitués mis en développement. Trois possibilités s'offraient à nous, soit l'utilisation de cellules souches embryonnaires (cellules ES), soit de blastomères provenant d'embryons donneurs plus âgés, soit le reclonage. L'utilisation de cellules ES chez les bovins n'en est encore qu'à ses débuts puisqu'une seule équipe a réussi à en obtenir, mais n'a pu les maintenir *in vitro* que pendant un laps de temps assez court (Sims et First, 1993). Quant à l'utilisation d'embryons donneurs plus âgés composés d'un nombre de cellules plus élevé, les résultats sont assez décevants car la plupart des cellules sont déjà marquées par un début de différenciation (Keefer et al, 1994). Vu notre expérience des techniques de micromanipulation, nous avons choisi d'utiliser les embryons reconstitués comme donneurs de blastomères pour un deuxième cycle de clonage, encore appelé reclonage.

Le reclonage a déjà été réalisé chez les amphibiens par Orr et al en 1986 et chez les mammifères par Willadsen en 1989 et par Westhusin et al en 1991. Stice et Keefer (1993) ont étudié les possibilités de production d'embryons bovins après plusieurs cycles de clonage et ont obtenu la naissance d'un veau suite au transfert d'un embryon produit après trois

cycles de micromanipulation, mais ils font état d'une grande variabilité des résultats entre les embryons donneurs.

A) Obtention de blastocystes suite au deuxième cycle de clonage:

Pour réaliser le deuxième cycle de clonage, nous avons utilisé comme donneurs les embryons obtenus à l'issue du premier cycle de clonage et laissé en développement pendant six jours. Cette culture a été réalisée in vitro en présence de cellules épithéliales de l'oviducte, comme décrit précédemment.

Tableau 14: Pourcentages de développement des embryons reconstitués après un premier et un deuxième cycle de micromanipulation:

1er cycle	Développement			Nb de Répétitions
	% moyens \pm DS	(Nb)	% extrêmes	
clivage (J3)	76 \pm 17	(198/228)	41-92	11
8-cell (J3)	22 \pm 10	(52/228)	8-36	11
morula (J6)	15 \pm 12	(33/228)	0-36	11
2ième cycle				
clivage (J3)	79 \pm 7	(237/303)	66-89	8
8-cell (J3)	30 \pm 9	(87/303)	18-43	8
blast.(J7)	15 \pm 12	(45/303)	0-41	8

Lors de cette expérience, la moyenne des embryons reconstitués a été de 25,2 à l'issue du premier cycle et de 19,7 lors du deuxième cycle. Nous avons constaté une grande variabilité dans les résultats, essentiellement en terme de pourcentage de blastocystes (Tableau 14). Il nous a semblé que certaines familles issues d'un embryon donneur avait une plus grande potentialité de développement que d'autres. Afin de vérifier cette hypothèse, un test de corrélation (test de Student) entre les résultats obtenus au premier et au deuxième cycle a été réalisé (Tableau 15). Cette analyse n'a pas pu mettre en évidence un effet famille car l'effectif des donneurs est trop peu important.

Tableau 15: Potentiel de développement des embryons clonés. Les donneurs ont été classés en fonction du taux de morulas obtenu après le premier cycle de clonage:

Donneurs	1er cycle		2ième cycle	
	Nb & % de Morulas (J6)		Nb & % de blastocystes (J7)	
1	9/30	30,0	9/56	16,1
2	6/22	27,3	15/37	40,1
3	5/26	19,2	2/33	6,1
4	4/22	18,2	1/10	10,0
5	3/21	14,3	6/37	16,2
6	2/17	11,8	6/40	15,0
7	3/30	10,0	6/43	14,0
8	1/11	9,1	0/47	0,0
9	0/12	0,0	/	/
10	0/15	0,0	/	/
11	0/22	0,0	/	/
Totaux	33/228	14,5	45/303	14,9

Corrélation: $r = 0,5047$; NS: $0,1 > p > 0,05$; test t de Student

B) Résultats du transfert des embryons du deuxième cycle de clonage:

Vingt-trois blastocystes obtenus après un deuxième cycle de micromanipulation ont été transférés dans 17 receveuses. La gestation a été suivie par dosage de la PAG (Pregnancy Associated Glycoprotein, Zoli et al, 1992) aux jours 35, 60 et 90. Les résultats sont présentés dans le tableau 16 et montrent que 23,5% des receveuses se sont révélées gestantes à 90 jours, soit un pourcentage identique à celui du premier cycle avec également un pourcentage élevé de mortalité embryonnaire précoce. Quatre vaches sur 17 (23,5%) ont évolué jusqu'au terme de leur gestation et ont donné naissance à 5 veaux (Planche 3c), ce qui correspond à 14,7% des embryons transférés.

Tableau 16: Résultats à 21, 35, 60 et 90 jours après transfert d'embryons du deuxième cycle de clonage. Ces résultats sont exprimés pour chacune des vaches transférées en fonction du jour du transfert et du nombre d'embryons transférés:

N° manip	N° vache	Transfert réalisé à	Nb d'embr.	Gestation confirmée à:				Nb de veaux
				21J ¹	35J ²	60J ²	90J ²⁺³	
149	8523	J8	1	+	+	-		
149	8529	J7	2	+	+	+	+	1
149	7684	J8	1	+	-			
149	4252	J8	1	-				
149	4253	J7	2	+	-			
149	8582	J7	2	+	-			
149	270	J7	2	+	+	+	+	1
149	260	J7	2	+	-			
149	7115	J7	2	+	+	?	-	
158	4985	J7	2	+	-			
158	1449	J7	2	+	+	+	-	
158	7687	J6	2	+	+/-	-		
159	278	J7	2	-				
159	7050	J7	2	-				
160	8527	J7	2	+	+	+	+	2
160	7115	J7	2	+	+	+	+	1
160	2098	J6	2	-				
Totaux:								
Nb	17		31	13	8	5	4	5
%				76,5	47,1	29,4	23,5	14,7

1: pas de manifestations œstrales; 2: dosage de la PAG (Pregnancy associated glycoprotein); 3: palpation rectale.

Chapitre IV:

Influence des conditions de transfert sur le pourcentage de gestation

Du fait du nombre restreint de vaches receveuses, et de l'effet multiplicateur du clonage, nous nous sommes fréquemment retrouvés avec un excédent d'embryons transférables. Afin d'en transférer un maximum, nous avons étudié l'opportunité d'un transfert simple ou double, ainsi que la possibilité d'effectuer des transferts asynchrones. Dans ce dernier cas, les embryons au septième jour de leur développement ont été transférés dans des receveuses qui étaient au sixième ou au huitième jour de leur cycle œstral.

A. Effet d'un transfert simple ou multiple sur le pourcentage de gestation:

Malgré que les différences ne soient pas significatives, les valeurs reprises dans le tableau 17 indiquent qu'il y a une tendance favorable au fait de transférer deux embryons plutôt qu'un seul. L'absence de différence significative est probablement due aux faibles effectifs des groupes n'ayant reçu qu'un embryon. Au vu des très faibles résultats obtenus après transfert d'un embryon, nous avons très vite opté pour un transfert double.

Tableau 17a: Taux de gestation et de mise bas après transfert d'embryons issus du premier ou du deuxième cycle de clonage en fonction du nombre d'embryons transférés (transferts synchrones plus asynchrones):

1er cycle	21J	35J	90J	Terme	Nouv-nés
Transfert (%) de 1 embryon	53,8 7/13	46,2 6/13	30,8 4/13	7,7 1/13 ^a	7,7 1/13 ^b
Transfert (%) de 2 embryons	80,0 12/15	66,7 10/15	60,0 9/15	26,7 4/15 ^a	16,7 5/30 ^b
Totaux (%)	67,8 19/28	57,1 16/28	46,4 13/28	17,8 5/28	13,9 6/43

Au sein d'une même colonne, les valeurs avec indices identiques ne sont pas significativement différentes ($p > 0,10$; test de Fischer).

2ième cycle:	21J	35J	90J	Terme	Nouv-nés
Transfert (%) de 1 embryon	66,7 2/3	33,3 1/3	0,0 0/3	0,0 0/3 ^a	0,0 0/3 ^b
Transfert (%) de 2 embryons	78,6 11/14	50,0 7/14	33,3 5/14	28,6 4/14 ^a	17,9 5/28 ^b
Totaux (%)	76,5 13/17	47,1 8/17	27,8 5/17	23,5 4/17	16,1 5/31

Au sein d'une même colonne, les valeurs avec indices identiques ne sont pas significativement différentes ($p > 0,10$; test de Fischer).

B. Effet de la synchronisation entre le développement de l'embryon et le cycle œstral de la receveuse sur la gestation:

Habituellement chez les bovins, le transfert de l'embryon se réalise au jour 7 du cycle œstral, moment auquel l'embryon a atteint le stade de blastocyste. Le jour 7 a été choisi parce qu'à cette période, la totalité des embryons se trouvent dans la cavité utérine où ils sont facilement récoltables et parce qu'ils sont aisément manipulables grâce à la présence

de la zone pellucide.

Tableau 18a: Taux de gestation et de mise bas en fonction des transferts synchrones ou asynchrones (1er cycle):

1er cycle	21J	35J	90J	Terme	Nouv-nés
Transfert synchrone	72,7 16/22	68,2 15/22	59,0 13/22	22,7 5/22 ^a	18,2 6/33 ^b
Transfert asynchrone	50,0 3/6	16,7 1/6	0,0 0/6	0,0 0/6 ^a	0,0 0/10 ^b
Totaux (%)	67,8 19/28	57,1 16/28	46,4 13/28	17,8 5/28	13,9 6/43

Au sein d'une même colonne, les valeurs avec indices identiques ne sont pas significativement différentes ($p > 0,10$; test de Fischer).

2ième cycle	21J	35J	90J	Terme	Nouv-nés
Transfert synchrone	83,3 10/12	50,0 6/12	33,3 4/12	33,3 4/12 ^a	20,8 5/24 ^b
Transfert asynchrone	60,0 3/5	40,0 2/5	0,0 0/5	0,0 0/5 ^a	0,0 0/7 ^b
Totaux (%)	76,5 13/17	47,1 8/17	23,5 4/17	23,5 4/17	16,1 5/31

Au sein d'une même colonne, les valeurs avec indices identiques ne sont pas significativement différentes ($p > 0,10$; test de Fischer).

Malgré que les différences ne soient pas significatives, les valeurs reprises dans le tableau 18 indiquent que lorsque les embryons sont transférés avec un jour de décalage (J6 ou J8), un plus grand pourcentage d'échecs est enregistré. L'absence de différence significative est ici également due au faible effectif.

C. Résultats corrigés ne tenant compte que des transferts synchrones de deux embryons:

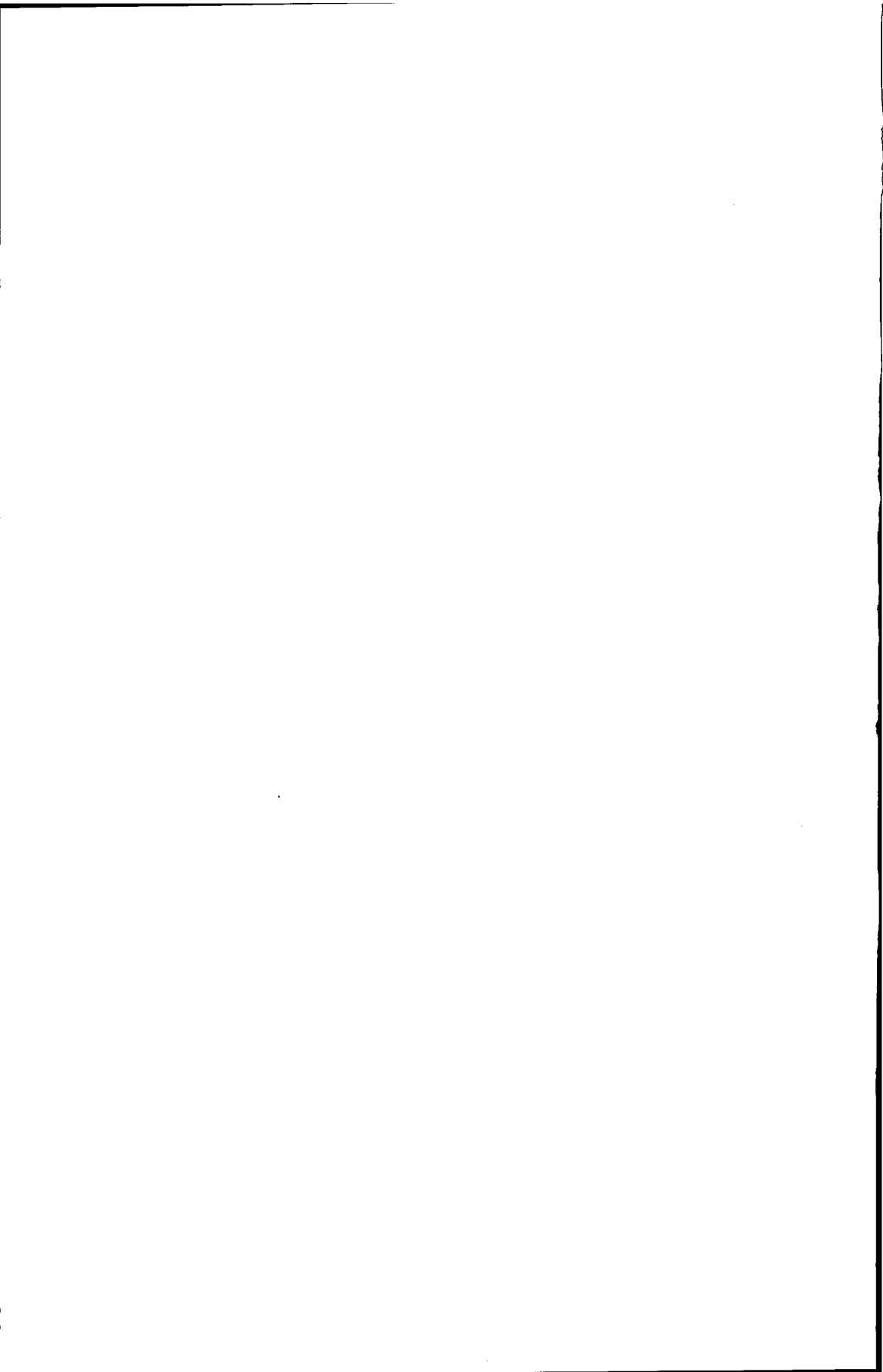
Lorsque l'on tient compte uniquement des transferts synchrones comportant deux embryons, le pourcentage de gestation obtenu atteint un niveau appréciable aussi bien pour le premier que pour le deuxième cycle de clonage (Tableau 19): 6 veaux (premier cycle) et 5 veaux (deuxième cycle) pour respectivement 28 et 24 embryons transférés, soit un taux de succès de 21,1% (11/52) premier et deuxième cycles de clonage confondus (Ectors F.J. et al, 1995 a et 1995: soumis).

Tableau 19: Taux de gestation suite à un transfert synchrone (J7) de 2 embryons provenant du 1er ou du 2ème cycle de clonage:

1er cycle	21J	35J	90J	Terme	Nouv-nés ^o
%	64,3 9/14	50,0 7/14	50,0 7/14	35,7 5/14 ^a	21,4 6/28 ^b
2ième cycle					
%	83,3 10/12	50,0 6/12	33,3 4/12	33,3 4/12 ^a	20,8 5/24 ^b

^o: N° veaux / N° d'embryons transférés.

Au sein d'une même colonne, les valeurs avec indices identiques ne sont pas significativement différentes ($p > 0,10$; test de Fischer).



D. Caractéristiques des veaux, issus des premier et deuxième cycles de clonage:

Tous les transferts ayant abouti à la naissance d'un veau ont été effectués au septième jour du cycle œstral. A l'exception de la gestation gémellaire, tous les veaux sont nés par césarienne, ce qui est très fréquent dans la race Bleu-Blanc Belge (BBB)¹.

L'analyse du tableau 20 montre que toutes les gestations, sauf une, sont secondaires à un transfert de deux embryons et que, même des embryons de classe² II à III, sont susceptibles de s'implanter et de donner lieu à une naissance. Lors du transfert d'embryons du premier cycle, toutes les gestations, à l'exception de la gestation gémellaire, ont dépassé leur terme de 6 à 16 jours, soit 9,6 jours en moyenne pour les gestations³ simples du premier cycle. Le poids moyen des veaux obtenus par gestation simple est de 40 Kg, ce qui est en dessous de la moyenne⁴ pour des veaux de race BBB. Lors du transfert d'embryons du deuxième cycle, nous avons également observé une prolongation de la gestation de 2 à 12 jours (6,8 jours en moyenne) pour les gestations simples du deuxième cycle. Le poids moyen des veaux obtenus par gestation simple est de 65 Kg, ce qui est élevé mais loin d'être exceptionnel pour cette race. Quant au sexe des veaux, nous avons enregistré une prédominance des mâles par rapport aux femelles.

1: Race viandeuse de la région wallonne du pays.

2: Classement qualitatif des embryons basé sur leur stade de développement et leur aspect morphologique: classe I: excellent embryon; II: bon; III: moyen et IV: mauvais.

3: Dans l'espèce bovine, la gestation a une durée moyenne de 281 jours avec de légères variations en fonction de la race (276 à 285 jours), du sexe du fœtus (mâle > femelle) et du nombre de fœtus (-3 à -6 jours en cas de gestation gémellaire).

4: Le poids des veaux à la naissance est également variable en fonction des races: les poids moyens des veaux sont de 49,5 Kg pour la race BBB, de 35 à 40 Kg pour la Holstein et de 40 Kg pour la Pie Rouge.

Planche 3:

A . Pâquerette, génisse née en 1989 après MIV, FIV, développement en lapine et congélation selon la méthode dite du transfert direct (Touati et Ectors, 1991).

B . Mannitol, veau mâle né en 1993 après transfert de noyau et développement in vitro en coculture.

C . Clone de trois génisses nées en 1994 après deux cycles de clonage.



a



b



c

Tableau 20: Caractéristiques des veaux obtenus:

Noms	A	B	C	D	E
1er cycle:					
Mannitol	95	2M (I+II)	+7	40	M
Zappatta	99	2B1 (II+III)	+6	35	M
Rouge	115	1B1 (II à III)	+13	40	M
Noir	117	2B1 (I+I)	+6	40	M
Laurel*	119	2B1 (II+II)	-7	30	M
Hardy*	119	2B1 (II+II)	-7	30	M
Castafiore	133	2B1 (II+III)	+16	45	F
2ième cycle:					
Dupond°	149	2B1 (II+II)	+12	70	M
Dupont°	149	2M (II+II)	+11	70	M
Nana°	160	2B1	+2	55	F
Decima* / °	160	2B1	+2	45	F
Martha* / °	160	2B1	+2	35	F

A: n° de la manipulation. B: nombre, type et classes des embryons transférés; B1=blastocyste et M=morula. C: nombre de jours eu plus ou en moins par rapport à la durée normale de gestation qui est de 281 jours. D: poids des veaux à la naissance (Kg). E: sexe des veaux. *: veaux jumeaux issus de la même receveuse. °: veaux jumeaux issus de receveuses différentes.

Chapitre V:

Contrôles des ovocytes et des embryons produits in vitro par FIV et par clonage

Afin de vérifier si les moyens mis en œuvre pour réaliser le clonage peuvent interférer sur le génome, modifier le sex-ratio et perturber le développement de l'embryon, nous avons procédé au sexage, à l'étude du caryotype et au comptage des blastomères des embryons produits.

Nous avons également suivi le déroulement de la gestation grâce au dosage de la PAG (Zoli et al, 1992). A la naissance, nous avons examiné les veaux, contrôlé l'état du placenta et du cordon ombilical et établi le caryotype de chacun des nouveau-nés. Enfin pour plusieurs d'entre eux, nous avons contrôlé leur courbe de croissance.

Comme le développement précoce de l'embryon est sous la dépendance du cytoplasme ovocytaire, nous avons étudié la qualité des ovocytes produits en fonction de la taille du follicule et donc du degré de compétence de l'ovocyte au moment de son prélèvement.

A. Contrôles effectués sur les embryons produits par FIV et par clonage.

Sexage:

Comme 75% des premiers clones étaient du sexe mâle, nous avons voulu savoir si cette modification du sex-ratio était le fait du hasard ou était dû à nos conditions de culture (Dufour et al, 1994). En effet, si les conditions de culture influencent la vitesse de développement de l'un des deux sexes, il se pourrait que nous retrouvions toujours des embryons donneurs du même sexe puisque nous utilisons des jeunes embryons (J5 à

J6) comme donneurs. Pour contrôler ces différentes hypothèses, les embryons produits par FIV et âgés de 6 jours ont été triés en trois groupes en fonction de leur stade de développement (dégénérés, morulas et jeunes blastocystes), puis fixés et leur sexe déterminé par amplification en chaîne de la polymérase (PCR) d'un satellite Y-spécifique (Grobet et al, 1992).

Résultats:

Les résultats sont repris dans le tableau 21. On remarque que pour chaque type d'embryons fixés, il y a une majorité d'embryons mâles et que cet excès de mâles est surtout marqué pour les embryons les plus développés. Le groupe de morulas présente le sex-ratio le plus équilibré, et comme c'est précisément parmi ce groupe que les embryons donneurs sont prélevés, nous pouvons nous attendre à obtenir un sex-ratio assez équilibré parmi les clones du premier cycle.

Tableau 21: Sexe des embryons produits par FIV en fonction du stade de développement atteint après 6 jours de coculture

Stades de développement:	D	M	JB	Totaux
Sexe:	37/73	22/40	33/47	92/160
Mâle	50,7 %	55,0 %	70,2 %	57,5 %
Femelle	31/73	16/40	9/47	56/160
	42,5 %	40,0 %	19,1 %	35,0 %
Non déterminé	5/73	2/40	5/47	12/160
	6,8 %	5,0 %	10,7 %	7,5 %

D: dégénérés; M: morulas; JB: jeunes blastocystes.

Parmi quelques familles issues du transfert de noyau, nous avons fixé et analysé par PCR les embryons les moins avancés dans leur développement dans le but de connaître le sexe de l'embryon donneur et en étudier l'influence sur le pourcentage de développement.

Au sein de notre petit échantillon, nous remarquons que le sex-ratio est équilibré (4 familles de clones femelles pour 4 familles de clones mâles). Lorsque nous comparons le sexe des embryons donneurs avec la moyenne de blastocystes obtenue dans chaque famille, nous remarquons qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux sexes: 23,6% de blastocystes parmi les clones femelles par rapport à 19,0% de blastocystes parmi les clones mâles.

Comptage des noyaux à J7 après clonage

Comme nous l'avions réalisé précédemment pour les embryons produits par FIV, les blastocystes obtenus par clonage (1 et 2ième cycles) ont été fixés et colorés au Hœchst 33342 de manière à pouvoir compter leurs noyaux et juger ainsi de la qualité des embryons produits (Planche 1f).

Tableau 22: Comparaison du nombre moyen de noyaux contenus dans les embryons produits par FIV, premier et deuxième cycles de clonage (fixation au J7):

	Moyenne \pm DS	Extrêmes	Nb d'embryons fixés
FIV	105,15 \pm 22,2	69-148	48
Premier cycle	63,8 \pm 4,9	35-135	25
Second cycle	49.1 \pm 5.0	30-83	11

Les résultats mentionnés dans le tableau 22 montrent qu'il y a approximativement deux fois plus de noyaux pour les embryons issus de la FIV que pour ceux issus du premier cycle de clonage (Ectors et al, 1995; Article 4).

Planche 4:

**Caryotype normal obtenu à partir d'une génisse
produite par transfert nucléaire.**

天 地 人 物 事 物 事 物
事 物 事 物 事 物 事 物
事 物 事 物 事 物 事 物
事 物 事 物 事 物 事 物

Caryotype

Nous avons rencontré de nombreuses difficultés pour mettre au point la technique de fixation des blastocystes. Jusqu'à ce jour, nous ne sommes pas parvenus à obtenir un étalement convenable des métaphases, si bien que la grande majorité des lames ne sont pas interprétables.

B. Suivi de la gestation et contrôles des veaux nouveau-nés obtenus par clonage.

Pour les génisses porteuses d'embryons issus du deuxième cycle de clonage, nous avons contrôlé l'activité du placenta en réalisant le dosage bimestriel de la PAG (Zoli et al, 1992). Cette glycoprotéine est présente dans le sang maternel dès le 35ième jour de la gestation et sa concentration augmente progressivement jusqu'à l'accouchement. Si la chute brutale du taux de PAG permet de conclure à la mortalité fœtale, les trop grandes variations individuelles ne permettent pas d'en tirer d'autres conclusions, notamment concernant le diagnostic de gestation gémellaire. Notons toutefois, qu'une vache porteuse de deux veaux a présenté des taux très élevés de PAG en fin de gestation.

Les poids des veaux à la naissance étaient normaux à l'exception de deux veaux jumeaux qui pesaient 70Kg. Ce poids élevé n'est cependant pas exceptionnel pour des veaux de race Bleu Blanc Belge, d'autant plus qu'ils sont nés 11 jours après le terme normal.

Le caryotype de tous les veaux s'est révélé parfaitement normal (Planche 4) et aucune anomalie morphologique n'a été décelée, si ce n'est une légère bouleture (rétraction du fléchisseur du boulet) qui s'est corrigée rapidement. Nous avons, par contre, relevé plusieurs anomalies placentaires. Dans un cas, le placenta¹ était œdémateux (\pm 20Kg!), très

1: La placentation de la vache est de type cotylédonnaire et comprend 70 à 100 cotylédons dont la taille maximale est de 12 cm sur 5. Le cordon ombilical présente un

épais (5 cm), accompagné d'un hydramnios et d'un œdème fœtal. Dans un second cas portant sur une gestation gémellaire, nous avons relevé une augmentation du nombre et du diamètre des cotylédons (± 200 cotylédons de ± 20 cm de diamètre!) ainsi qu'une hypertrophie du cordon ombilical (± 5 cm de diamètre). Sur l'un des placentas, nous avons trouvé une môle hydatiforme. Nous ne pouvons, jusqu'à présent, avancer une explication valable à ces anomalies mais nous continuons à suivre attentivement l'évolution de la gestation des receveuses porteuses d'embryons clonés.

C. Comparaison de la qualité des ovocytes en fonction du diamètre folliculaire.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (voir article 4, pages 104 et suivantes):
Ectors F.J., Koulischer L., Jamar M., Herens C., Verloes A., Remy B., Beckers J-F.
Cytogenetic study of bovine oocytes matured in vitro. *Accepté dans Theriogenology.*

Introduction

Ainsi que nous venons de le voir, le pourcentage de blastocystes produits par MIV, FIV et développement in vitro n'excède pas 30% et cela indépendamment de la méthode de développement utilisée. Il apparaît donc que la maturation et la fécondation in vitro de l'ovocyte ne sont encore qu'imparfaitement maîtrisées surtout dans le cas où les ovocytes sont prélevés sur des ovaires récoltés aux abattoirs et provenant d'animaux à un stade quelconque de leur cycle œstral.

Le développement précoce de l'embryon étant sous la dépendance exclusive des réserves ovocytaires, nous avons voulu déterminer à partir de quelle taille un follicule peut être ponctionné pour que l'ovocyte puisse avoir toutes les chances d'assurer un développement harmonieux de l'embryon dans nos conditions de culture in vitro.

Plusieurs auteurs ayant démontré une plus grande capacité au développement in vitro pour les ovocytes provenant de follicules de taille supérieure à 3 à 5 mm (Moor et Trounson, 1977; Crozet, comm. pers., 1993; Barnes et al, 1993b; Pavlok et al, 1992), nous avons choisi d'étudier la maturation nucléaire et cytoplasmique de trois groupes de COC en fonction de la taille des follicules dont ils proviennent: soit des follicules de 1 à 4, de 5 à 8 et de 9 à 12 mm. L'appréciation des diamètres s'est faite à l'œil nu sans dissection préalable des follicules, méthode qui ne nous aurait pas permis d'obtenir un nombre suffisant d'ovocytes. Après 25 heures de MIV, les transformations nucléaires ont été contrôlées en vue de déterminer quel était le pourcentage d'anomalies métaphasiques.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le service de Génétique Humaine du Professeur Koulischer du C.H.U. de l'Université de Liège (Koulischer et al, 1993; Ectors F.J. et al, 1995b).

Résultats:

Sur 376 métaphases observées (Tableau 23), nous avons dénombré 341 métaphases II (93,4%) et 24 métaphases I (6,6%) et aucune différence entre les ovocytes provenant des différents groupes n'a été observée. Il faut cependant rappeler que la taille des follicules a été évaluée morphologiquement et que l'imprécision de la mesure induit certainement un chevauchement des différents groupes.

Tableau 23: Résultats de l'analyse des métaphases ovocytaires en fonction de la taille des follicules:

Types de follicules:	Petits 1-4 mm	Moyens 5-8 mm	Grands 9-12 mm	Totaux 1-12 mm
Nb d'ovocytes fixés	467	186	250	903
Métaphases:	% (Nb)	% (Nb)	% (Nb)	% (Nb)
I	7,2 (12)	8,5 (8)	3,8 (4)	6,6 (24)
II	92,8 (154)	91,5 (86)	96,2 (101)	93,4 (341)
Totaux I + II	166	94	105	365

Parmi les plaques métaphasiques précédentes, 91 (24,9%) étaient suffisamment étalées pour que les chromosomes puissent être comptés. La plupart d'entre-elles étaient constituées d'un nombre normal de chromosomes¹: 20/22 (90,9%) métaphases I (Planche 5a) et 56/69 (81,2%) métaphases II (Planche 5b). Les anomalies observées étaient les suivantes: 2 métaphases I avec de nombreux univalents (9,1%; Planche 5c), 4 métaphases II diploïdes (60 chromosomes; Planche 5d), 8 métaphases II avec de 31 à 34 chromosomes et 1 métaphase II avec 26 chromosomes (Tableau 24).

1: Le caryotype normal de la vache est composé de 60 chromosomes.

Planche 5:

Ovocytes fixés après 24-25 heures du MIV et colorés à l'orcéine (grossissement: x100).

A. Métaphase I normale montrant 30 bivalents.

B. Métaphase II normale montrant 30 chromosomes.

C. Métaphase I anormale montrant quelques bivalents (flèches) et de nombreux chromosomes isolés.

D. Métaphase II diploïde.

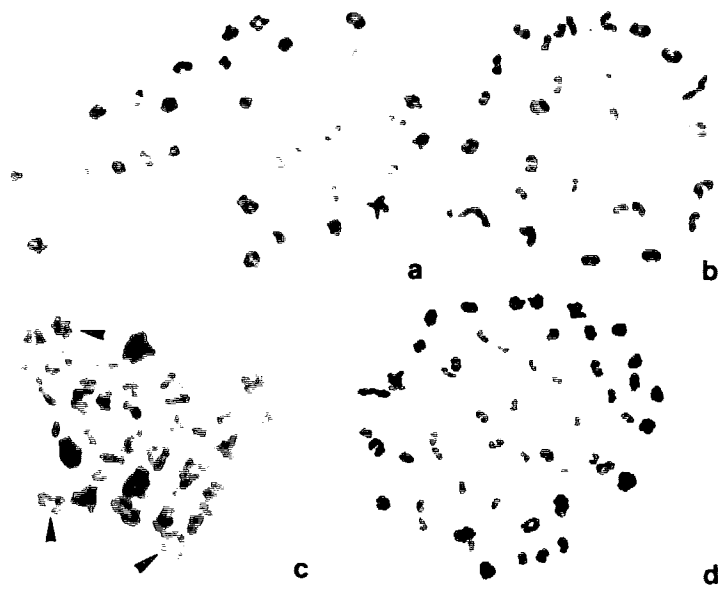


Tableau 24: Pourcentages et nombres de métaphases II constituées de <30, 30, >30 et 60 chromosomes:

Nb de chromosomes:			
<30	30	>30	60
1,4% (1)	81,2% (56)	11,6% (8)	5,8% (4)

Le seul moyen dont nous disposons pour étudier la maturation cytoplasmique est d'enregistrer les pourcentages de blastocystes obtenus après FIV de COC. Ce travail est actuellement en cours et des résultats préliminaires montrent que les COC ponctionnés à partir de follicules de tailles petite (1 à 4mm) et moyenne (5 à 8mm) donnent des pourcentages de développement supérieurs à ceux provenant des follicules de grande taille.

4: DISCUSSION GENERALE



La première partie de notre travail a permis de mettre au point les conditions optimales de développement in vitro des embryons bovins en comparant trois méthodes décrites dans la littérature, à savoir: le transfert temporaire dans l'oviducte de la lapine, le développement in vitro en présence de cellules épithéliales tubaires bovines (coculture) ou de leurs produits de sécrétion (milieu conditionné). Cette étude a été réalisée dans le but de pouvoir disposer d'un grand nombre d'embryons donneurs de qualité, mais également de pouvoir assurer le développement des embryons reconstitués par transfert de noyau, embryons qui sont probablement plus fragiles et plus exigeants (Ectors F.J. et al, 1993a).

De l'analyse des pourcentages de blastocystes obtenus par ces différentes techniques (Tableaux 3 et 5), il ressort que l'utilisation des milieux conditionnés (MC: 18,5%) et de l'oviducte de lapine (17,4%) fournit des résultats supérieurs à la technique de coculture (de 10,3%). Ces résultats doivent être quelques peu corrigés car le développement dans l'oviducte de lapine occasionne des pertes importantes, le taux de récupération des embryons n'étant que de 66,8% (127/190). L'origine de ces pertes peut être multiple à savoir: problèmes au moment de l'injection ou de la récupération, infection ou encore expulsion dans la cavité péritonéale suite aux contractions péristaltiques de l'oviducte. Diverses solutions ont été préconisées pour les éviter, telles que la pose d'une ligature sur le pavillon ou l'enrobage des embryons dans des cylindres d'agar. Aucune de ces solutions n'a donné satisfaction: la première perturbe la vascularisation tubaire, induit un hydrosalpinx et nuit au développement des embryons, la seconde est de réalisation technique très délicate.

La qualité des embryons, testée par la détermination du nombre de noyaux qu'ils contiennent, est supérieure lorsqu'on utilise la lapine (107,33 noyaux) ou la coculture (de 100,15 à 105,15 noyaux) comme support de développement (Tableaux 4 et 6). Cette observation a également été confirmée lorsque nous avons testé la résistance à la cryopréservation de ces différents types d'embryons. En effet, si la

plupart des embryons développés sur lapine ou en coculture ont résisté à la cryopréservation et ont donné lieu à des gestations (Ectors F.J. et al, 1989), il n'en a pas été de même avec les embryons développés en milieu conditionné.

Ces constatations nous ont conduit à éliminer la technique du milieu conditionné car les blastocystes produits possèdent un nombre de blastomères trop peu élevé, ce qui laisse préjuger d'une trop faible viabilité. De même, nous avons écarté le développement dans l'oviducte de la lapine en raison de sa lourdeur d'application et des pertes d'embryons enregistrées.

La méthode de la coculture fut donc finalement retenue car elle est de réalisation facile et les embryons produits sont de bonne qualité. D'après Gandolfi et Moor (1987) et Gandolfi et al (1989), si les cellules épithéliales de l'oviducte sécrètent des protéines spécifiques et des facteurs de croissance nécessaires pour le développement de l'embryon, le contact entre l'embryon et ces cellules est également très important. Elles transforment ou éliminent les métabolites provenant du développement de l'embryon, elles évoluent parallèlement à sa croissance et s'adaptent à ses besoins. Ce dernier point apporte une explication à la moins bonne qualité des blastocystes obtenus en milieu conditionné.

Après avoir déterminé nos conditions optimales de développement, nous nous sommes attachés à la mise au point des paramètres du clonage: tension de l'impulsion de fusion-activation, contrôle de l'énucléation et âge optimal des cytoplastes receveurs.

En ce qui concerne les paramètres d'activation, des tensions échelonnées de 0 à 130 Volts ont été testées. Nous avons ainsi déterminé que l'activation maximale est obtenue pour une stimulation de 50 Volts, avec des valeurs extrêmes allant de 40 à 70 Volts (Tableau 8). Comme selon Collas (1989) l'activation ovocytaire est maximale pour des valeurs de tension proches de la valeur létale, nous avons choisi une valeur de 65

Volts pour les manipulations suivantes. L'efficacité de ce traitement activateur a été étayée par le fait que 50% des ovocytes activés de manière parthénogénétique ont clivé et 6% d'entre eux se sont développés (Tableau 9). Ce faible taux de développement parthénogénétique est analogue à ceux cités dans la littérature. En effet, si Fukui et al ont obtenu en 1992 de 2,8 à 10,9% de blastocystes, par contre Yang et Smith (1993), Prochazka et al (1993) et Minamihashi et al (1993) n'en ont jamais obtenu plus de 5%. Pour la poursuite de nos travaux, l'impulsion utilisée pour obtenir la fusion et l'activation sera donc de 65 Volts pendant 50µsec.

Le contrôle de l'énucléation a été réalisé par la révélation, en lumière UV, de l'ADN coloré par le Hœchst 33342 (Westhusin et al, 1992). Ce dernier est un dérivé bisbenzimidazole qui se fixe spécifiquement sur les bases adénine et thymine de l'ADN. Westhusin et al (1992) ainsi que Smith en 1993, ont montré qu'à une concentration de 5 µg/ml, et à condition de contrôler le temps d'exposition ainsi que l'intensité de la lumière UV ($\lambda=365\text{nm}$; durée d'illumination inférieure à 10 secondes), cette technique n'avait aucun effet délétère sur la membrane et le cytoplasme ovocytaire.

L'application de ce procédé a montré que 28,8% des ovocytes étaient imparfaitement énucléés (Tableau 10). Le retrait de ceux-ci permet d'éviter les risques de polyploïdie.

Afin de déterminer l'âge optimal que le cytoplaste receveur doit avoir au moment de l'activation, des ovocytes âgés de 25, 34, 44 et 54 heures ont été activés et les pourcentages de développement parthénogénétique ont été comparés. L'efficacité du traitement activateur augmente avec l'âge de l'ovocyte jusqu'à 44 heures puis chute très rapidement (Tableau 11). Ces résultats sont analogues à ceux obtenus par Ware et al (1989), Liebfried-Rutledge et al (1992), Heyman et al (1992b), Barnes et al (1993a) et enfin Takano et al (1993). Ces auteurs ont démontré que l'amélioration du taux de développement après transfert nucléaire fait suite à l'utilisation d'ovocytes plus âgés, et par conséquent plus sensibles au stimulus activateur (Ware et al, 1989). Il faut cependant

tenir compte du fait que le vieillissement de l'ovocyte n'est pas sans risque (vieillesse métabolique) pour le développement ultérieur de l'embryon (Rao et al, 1993).

Heyman et al (1992b) ont montré que l'aptitude des ovocytes receveurs à intégrer un noyau augmente lorsque la durée de la maturation passe d'une période de 26 à 34 heures à une période de 36 à 41 heures. Après la maturation, l'ovocyte arrête son cycle cellulaire en phase M (métaphase II) du fait d'une forte concentration en MPF (Gerhart et al, 1984). Il s'ensuit que le noyau d'un blastomère transféré dans ce cytoplaste riche en MPF, va rompre sa membrane nucléaire et condenser prématurément ses chromosomes (PCC). Si selon Collas et al (1991), le transfert nucléaire est plus efficace lorsqu'il est réalisé avec des ovocytes receveurs métaphasiques (MPF élevé), il semble au contraire que dans ces conditions, seuls les blastomères au stade G1 sont utilisables et donneraient lieu à un développement embryonnaire normal (Campbell et al, 1994) ce qui est fort peu intéressant puisque approximativement 80% des blastomères constituant un embryon âgé de 5,5 jours sont en phase S (Barnes et al, 1993a).

La prolongation du séjour des ovocytes dans leur milieu de maturation avec comme corollaire la diminution partielle de la concentration ovocytaire en MPF, nous a permis de contourner en partie le problème de la synchronisation des cycles cellulaires entre le cytoplaste receveur et l'embryon donneur (Prather et al, 1992; Campbell et al, 1993, 1994).

Le protocole de clonage ainsi défini a été utilisé pour comparer trois types d'embryons donneurs: soit produits in vivo et utilisés avec ou sans congélation préalable (récoltés à J5 après abattage de vaches superovulées), soit produits in vitro en coculture. Cette comparaison a pour but de vérifier si ces conditions de développement in vitro en coculture sont capables de produire des embryons donneurs susceptibles de supporter les micromanipulations et la reprogrammation nucléaire. Elle a

également pour objectif d'analyser si la congélation des donneurs est compatible avec le clonage.

Lorsqu'on analyse les taux de stades VIII (Tableau 12), l'absence de différence significative entre les trois groupes illustre une fois de plus que le développement précoce de l'embryon est sous la dépendance des réserves en ARNm et protéines d'origine maternelle et est indépendant du nouveau génome.

Quant aux taux de blastocystes obtenus lors de l'utilisation d'embryons donneurs non congelés, produits soit *in vivo* soit *in vitro*, ils ne diffèrent pas de manière significative (13,1 versus 11,5%). Par contre, lorsque l'on utilise des embryons congelés, même si ces derniers sont produits *in vivo*, le taux de blastocystes obtenu est significativement inférieur (2,2%) à celui des deux groupes précédents.

Il est bien connu que la congélation entraîne des lésions cellulaires profondes et létales pour approximativement la moitié des cellules constituant un embryon; ce phénomène est encore amplifié par le fait que les embryons donneurs ont été congelés au jour 5,5 de leur développement, stade peu favorable pour la réussite de la congélation. Westhusin et al (1991) ont démontré qu'un simple refroidissement à 4°C provoquait déjà la fragilisation des membranes des embryons donneurs, fragilisation qui est encore augmentée lorsque l'embryon est soumis au cycle de congélation-décongélation. Ces auteurs ont observé, comme nous, une lyse membranaire très importante dans les 3 à 7 heures qui ont suivi leur réchauffement ou leur dégel. Cette fragilité membranaire se manifeste particulièrement lors de la micromanipulation.

Ces résultats correspondent à ceux publiés par Heyman et al (1994) qui signalent des taux de développement similaires pour les embryons reconstitués à partir de donneurs produits *in vivo* ou *in vitro*. Ils ont également décrit que les embryons congelés sont moins aptes à servir de donneurs pour le clonage.

Dans nos conditions expérimentales, les taux de développement obtenus après clonage (11,5%; cfr Tableau 12a et c) n'atteignent pas la moitié des taux obtenus après FIV (27,3%; cfr Tableau 5). Comme l'origine des ovocytes (abattoir) et les conditions de développement (coculture) sont identiques dans les deux cas, tout porte à croire que la maturation prolongée, les conditions de micromanipulation ou encore la reprogrammation nucléaire altèrent le potentiel de développement des embryons reconstitués.

Toutefois, comme les pourcentages de blastocystes obtenus à partir de donneurs produits in vivo (7 jours de coculture) ou in vitro (12 jours de coculture) sont comparables, on peut en conclure que la durée et les conditions de développement en coculture sont compatibles avec le transfert de noyau.

La possibilité d'utiliser les embryons produits in vitro comme donneurs de blastomères est un acquis important car elle augmente de façon considérable l'efficacité du clonage en permettant la production d'un grand nombre d'embryons donneurs, une meilleure programmation du travail et surtout d'utiliser les embryons reconstitués comme donneurs pour un deuxième cycle.

Parmi les blastocystes obtenus après le premier cycle de clonage, trente-cinq ont été transférés et 7 ont donné lieu à la naissance d'un veau. Parmi ceux-ci, un seul provient d'un donneur produit in vitro et aucun veau n'est issu d'un donneur ayant subi la congélation. Lors du suivi des gestations, on constate que la plus grande partie des échecs se situe entre le 21^{ème} et le 90^{ème} jour de gestation. Parmi les facteurs responsables de ces mortalités embryonnaires, on ne peut exclure des altérations fonctionnelles du génome donneur qui peuvent entraîner des dérégulations métaboliques en cours de développement (Renard, communication personnelle). Comme autre cause d'échec, il ne faut pas négliger les anomalies chromosomiques. En effet, Collas et al (1992) ont clairement montré qu'il existe chez le lapin une relation entre le cycle cellulaire du

blastomère donneur et le pourcentage d'anomalies chromosomiques observées au niveau de l'embryon reconstitué.

Les résultats obtenus suite au deuxième cycle de clonage sont pratiquement identiques à ceux enregistrés lors du premier cycle de micromanipulation (Tableau 14). Les noyaux de ces embryons sont donc capables d'être "dédiérenciés" une deuxième fois, et sont aptes à se développer jusqu'au stade blastocyste.

Une moyenne de 19,7 embryons reconstitués a été obtenue par donneur lors de la réalisation du deuxième cycle contre 25,2 lors du premier cycle. Ces chiffres sont légèrement inférieurs à ceux publiés par Stice et Keefer (1993) qui obtiennent 27,5 reconstitués par donneur, au premier comme au deuxième cycle.

Comme Westhusin et al en 1991 ainsi que Stice et Keefer en 1993, nous avons constaté une grande variabilité dans les résultats (Tableau 14). Jusqu'à ce jour, aucune explication vraiment valable ne peut être avancée pour expliquer ce phénomène. Il faut rechercher l'origine de cette variabilité soit au niveau de l'ovocyte receveur, soit de l'embryon donneur. Il est actuellement admis que seulement 30% des ovocytes soumis à la MIV et à la FIV sont aptes à assurer un développement jusqu'au stade blastocyste. Ce faible pourcentage est lié à une très grande hétérogénéité des ovocytes récoltés couplée à des conditions de maturation qui sont encore loin d'être idéales. Cette très grande variabilité trouve également son explication au niveau du cycle cellulaire des blastomères constituant le donneur ainsi que dans des facteurs relevant de l'embryon lui-même. En effet, Stice et Keefer (1993) ont observé que certaines familles de clones se développaient mieux que d'autres. Afin de vérifier cette constatation, nous avons classé les donneurs suivant le pourcentage de morulas obtenu à l'issue du premier cycle et nous les avons comparés avec les taux de blastocystes obtenus au deuxième cycle (Tableau 15). Un effet famille ne peut être statistiquement mis en évidence vu le petit nombre de répétitions mais l'analyse du tableau 15 montre que certains

donneurs sont plus ou moins aptes que d'autres à supporter le clonage et le reclonage si bien, qu'actuellement, nous ne pouvons pas formellement exclure un effet famille.

Si Willadsen (1989) a décrit la manière de réaliser plusieurs cycles de clonage, seuls Westhusin et al (1991) et Stice et Keefer (1993) ont publié leurs résultats. Bien qu'ils aient utilisé des embryons donneurs produits in vivo et l'oviducte de la lapine pour le développement des embryons reconstitués, leurs résultats ne sont pas significativement différents des nôtres.

Le transfert des blastocystes issus du deuxième cycle de clonage a permis d'obtenir la naissance de 5 veaux pour 31 embryons transférés (Tableau 16). Ici également, les gestations qui évoluent au-delà de premier trimestre arrivent à terme.

Tant pour les embryons du premier cycle que pour ceux de deuxième cycle, l'analyse du tableau 17 montre que la réalisation de transferts doubles semble favorable à l'induction de la gestation. Lors d'expériences sur la bissection des embryons, Touati et Ectors F. (1991) et Touati (1993) ont démontré qu'il était préférable de transférer les deux demi-embryons chez une même receveuse plutôt que de les transférer dans des receveuses différentes. Cet effet bénéfique peut s'expliquer par la présence d'un nombre plus important de cellules trophoblastiques, si bien que l'action du signal embryonnaire s'en trouve renforcée tant en intensité qu'en durée. En effet, Martal et al (1979), Ellinwood et al (1979), Martal et al (1984) et Heyman et al (1984) ont montré que l'instillation dans l'utérus de vaches cyclées d'homogénats d'embryons âgés de 15 à 23 jours ou de vésicules trophoblastiques âgées de 15 à 26 jours prolongent la vie du corps jaune. Cette action est due à la trophoblastine, facteur anti-lutéolytique d'origine trophoblastique qui est de nature protéique (bTP1) et présente un poids moléculaire de 20.000 kD. Pour assurer la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gestatif, cette trophoblastine est sécrétée par le placenta du 15 au 25^{ième} jour du cycle,

avant le début de la lutéolyse.

Le bénéfice des transferts doubles doit cependant être quelque peu pondéré suite aux inconvénients inhérents à la gestation gémellaire chez les bovins: accouchement prématuré, diminution du poids des veaux, augmentation du risque de rétention placentaire...

Le tableau 18 démontre l'effet favorable sur le pourcentage de gestation de la synchronisation entre le développement de l'embryon et le cycle œstral de la receveuse. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en cas d'asynchronisme, le signal embryonnaire est sécrété soit trop tôt alors que le corps jaune ne possède pas encore de récepteur au signal embryonnaire, soit trop tard alors que la lutéolyse est déjà amorcée. Les deux types de transferts asynchrones (jours 6 et 8) n'ont pas été analysés séparément du fait du trop faible effectif. Néanmoins, ces résultats tendent à démontrer la nécessité d'une bonne synchronisation entre l'embryon et la receveuse.

En ne tenant compte que des transferts synchrones de deux embryons, les pourcentages de gestation obtenus atteignent un niveau très appréciable aussi bien pour le premier que pour le deuxième cycle de clonage (Tableau 19). L'absence de différence significative entre les deux cycles, en terme de veaux nés par rapport au nombre de blastocystes transférés, montre que 21,2% (11/52) des embryons produits par clonage et reclonage sont capables d'engendrer une gestation évolutive. Concernant le premier cycle, ces résultats concordent avec ceux présentés par Bondioli et al (19,5%; 1991), Westhusin et al (20 à 23%, 1991) et Stice et Keefer (10%, 1993) alors que Willadsen et al (1991) ont enregistré des résultats nettement supérieurs, soit 36,4% de veaux nouveau-nés. Tous ces auteurs ont utilisé des embryons donneurs produits *in vivo* et ont développé les embryons reconstitués dans des oviductes de brebis. Heyman et al (1994) ont utilisé également des embryons donneurs produits *in vivo* mais ont cultivé leurs embryons reconstitués en coculture et ils ont obtenu 32% de veaux. Nous n'avons pas connaissance dans la littérature de la naissance de veaux consécutive aux transferts de

blastocystes produits par une technique totalement réalisée in vitro, aussi bien pour les donneurs que pour les embryons reconstitués. Concernant le reclonage, seuls Stice et Keefer (1993) ont publié leurs résultats, mais ils ne font état que d'un veau pour 48 embryons transférés, soit 2% de réussite.

Le taux de mortalité embryonnaire est donc relativement élevé après transfert d'embryons clonés. Ce phénomène est observé dans d'autres espèces telles que les amphibiens, la souris, le lapin, le porc et le mouton (First et Prather, 1991). Chez les amphibiens, Gurdon (1974) et DiBerardino et Hoffner (1970) l'ont attribué à des anomalies chromosomiques.

L'analyse du tableau 20 ne permet pas de relever d'augmentation de la longueur de la gestation ni du poids des veaux nouveau-nés, ces résultats concordent avec les observations d'Heyman (communication personnelle). Par contre, Willadsen et al (1991) et Stice et Keefer (1993) signalent certains cas de prolongation de la gestation et rapportent quelques cas de gigantisme, problèmes évoqués également par Bondioli (1992), Yang (1991), Yang et Anderson (1992). Westhusin et al (1995) ont démontré des altérations de l'expression de certains facteurs de croissance (sur-expression de l'IGF2 et du TGF α ; sous-expression de l'IGF1) ou de leur récepteur (sur-expression de l'IGF1-R) au sein des embryons produits par transfert de noyau. Si ces observations se révèlent exactes, on peut penser que ces modifications sont impliquées dans la réduction de la viabilité des embryons, dans les taux élevés d'avortement, tout comme dans l'augmentation du poids des veaux à la naissance. Les seules anomalies que nous avons observées se situent au niveau du placenta: hypertrophie, hydramnios ou môle hydatiforme mais, jusqu'à présent, aucune explication valable n'a été émise pour expliquer ces lésions.

L'analyse du tableau 20 fait état d'un déséquilibre entre les clones mâles et femelles: 6 mâles par rapport à 2 femelles. Pour tenter d'expliquer ce déséquilibre, nous avons émis l'hypothèse qu'un sexe pouvait se développer avant l'autre. Etant donné que pour le clonage nous utilisons de jeunes embryons comme donneurs, ceux-ci pouvaient donc être toujours du même sexe. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé le sexe des embryons produits par FIV, en classant ces derniers en fonction de leur stade de développement. Les résultats montrent que pour chaque type d'embryon fixé, il y a effectivement une prédominance des mâles. Ce déséquilibre se marque surtout pour le stade blastocyste, alors qu'il apparaît nettement moins prononcé pour le stade morula, stade qui sert de donneur pour le clonage. De fait, lorsqu'on analyse le sexe des familles de clones, nous remarquons un sex-ratio équilibré, alors qu'à la naissance, il y a un déséquilibre du sex-ratio en faveur des veaux mâles; cependant l'échantillonnage dont nous disposons est vraiment trop petit que pour pouvoir tirer des conclusions valables. Signalons encore qu'un excès de mâles a déjà été observé par différents auteurs dans le cas des embryons produits par FIV (Avery et al, 1991, 1992; Van Soom et al, 1994). Ces derniers ont obtenu un rapport mâle/femelle de 71,4% en faveur des veaux mâles. Dufour et al (1994) pensent qu'il faille rechercher la cause de la supériorité numérique des mâles dans les conditions de culture: ils suspectent que l'excès de glucose défavorise le développement des embryons femelles. Il n'existe à l'heure actuelle encore aucune preuve qui permette de confirmer cette hypothèse.

Parallèlement aux transferts d'embryons clonés, certains blastocystes ont été fixés dans le but de dénombrer le nombre de noyaux qu'ils contiennent. Les résultats mentionnés dans le tableau 22 montrent qu'il y a approximativement deux fois plus de noyaux pour les embryons issus de la FIV que pour ceux issus du premier cycle de clonage. Les embryons clonés auraient probablement un cycle de division cellulaire en retard. Les causes de cet effet délétère doivent être recherchées dans les nombreuses manipulations du clonage telle que l'énucléation qui enlève 1/4 du cytoplasme ovocytaire. Si cette diminution du nombre de noyaux

est déjà présente dans les embryons du premier cycle, elle est légèrement plus marquée après reclonage, ce qui semble indiquer que la durée de culture *in vitro* est également responsable de cette réduction.

Lors de la FIV, la production de blastocystes ne dépasse guère les 30%. Ces résultats relativement faibles sont à attribuer à une réduction de la compétence ovocytaire, ou capacité de l'ovocyte à réaliser avec succès les maturations nucléaire et cytoplasmique. Les conditions de maturation employées jusqu'à présent ne sont pas parfaitement adaptées à la majorité des ovocytes prélevés. Peut-être faut-il ponctionner des follicules plus grands et donc utiliser des ovocytes mieux préparés pour l'étape finale de la maturation. Pour juger de la qualité des ovocytes, nous avons analysé la maturation nucléaire de COC issus de follicules de différentes tailles. Sur la totalité des ovocytes étudiés, nous avons relevé 2,9% (11/376) de métaphases II anormales, ce qui correspond aux résultats enregistrés par Jagiello et al (1974) ainsi que 6,4% de métaphases I (24/376), pourcentage déjà relevé par Xu et al (1986). La présence de métaphases I normales après 24 heures de maturation avait déjà été décrite par Hyttel et al (1987).

Si on compare les résultats des trois groupes d'ovocytes, on est forcé de constater qu'il n'y a pas de différence significative dans les taux de métaphases I et II. Ces résultats montrent que, pour nos conditions expérimentales, la maturation nucléaire de l'ovocyte n'est pas influencée par la taille du follicule dont il provient. Quant à l'aptitude au développement, Tan et Lu (1990) et Lonergan et al (1994) ont rapporté un net avantage pour les ovocytes provenant de follicules de grande taille. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus ne semblent pas confirmer cette constatation mais montrent un taux de développement supérieur pour les COC provenant de follicules de tailles petite et moyenne. Il faut cependant faire remarquer que nous ne connaissons pas le cycle œstral des animaux, si bien que les gros follicules que nous ponctionnons sont peut-être déjà soumis à l'atrésie. Une autre cause d'échec pourrait provenir de conditions de MIV peu adaptées à ce type de

COC. De cette étude, il ressort que la maturation nucléaire de l'ovocyte ne permet pas de juger de la maturation cytoplasmique.

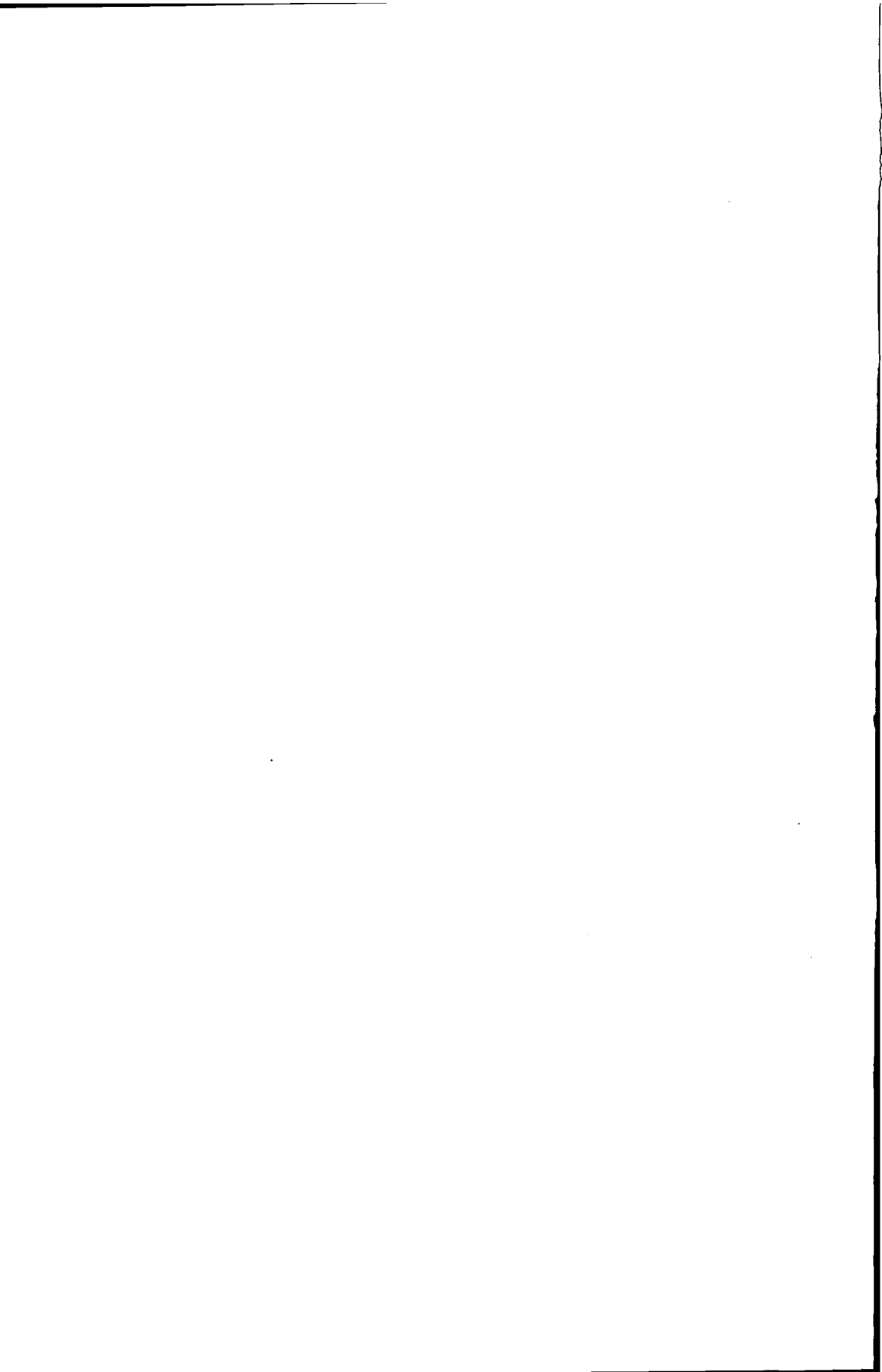
Au cours de notre travail, nous avons montré que dans nos conditions expérimentales et pour les critères utilisés, les embryons obtenus in vitro en coculture sont qualitativement identiques aux embryons développés en lapine (% de blastocystes; nombre de noyaux, aptitude à être utilisés comme donneurs pour le clonage). La coculture s'est révélée être un moyen efficace pour le développement des embryons issus de la FIV (7 jours in vitro), du clonage (12 jours in vitro) et même du reclonage (20 jours in vitro). A chaque étape, des veaux ont été obtenus, preuve irréfutable de l'aptitude des blastocystes produits à engendrer une gestation évolutive. Concernant le transfert de noyau, nos résultats en terme de veaux nés par rapport au nombre d'embryons transférés, sont légèrement inférieurs voir équivalents aux résultats présentés dans la littérature pour le premier cycle, et sont supérieurs à ceux présentés par Stice et Keefer (1993) pour le reclonage. Il faut noter que tous les résultats mentionnés dans la littérature ont été obtenus grâce à l'emploi d'embryons donneurs produits in vivo. Les naissances que nous avons enregistrées résultent d'une production d'embryons réalisée totalement in vitro tant pour les embryons donneurs et les cytoplastes receveurs que pour la culture des embryons reconstitués au premier comme au deuxième cycle de micromanipulation.

En dehors de problèmes placentaires, les contrôles effectués n'ont pas mis en évidence d'altération imputable au transfert de noyau. Une modification du sex-ratio secondaire aux conditions de développement n'a pas pu être exclue.

Une tentative de sélection des ovocytes sur base de la taille de son follicule n'a pas donné de résultat car les critères utilisés, basés sur l'évaluation de la morphologie nucléaire, ne permettent pas d'évaluer la maturation cytoplasmique. Cette dernière conditionne de manière prépondérante l'aptitude ovocytaire à assurer le développement après FIV et clonage.



**5: CONCLUSIONS GENERALES
ET PERSPECTIVES**



Dans les conditions naturelles, la sélection et la multiplication des sujets d'élite, dans les espèces domestiques unipares et à gestation de longue durée, requièrent un temps considérable. L'insémination artificielle, la superovulation et la transplantation embryonnaire ont apporté d'importants progrès en ces domaines.

Dernière née de ces techniques, la transplantation embryonnaire est en partie limitée dans son expansion en raison de l'inconstance des résultats obtenus lors de la superovulation, condition primordiale pour obtenir un nombre suffisant d'embryons à transférer.

La technique de fécondation in vitro et celle, plus récente, du clonage par transfert de noyau permettront dans un avenir plus ou moins rapproché de compenser cet inconvénient. Les ovocytes prélevés au niveau de l'ovaire, soit lors de l'abattage soit par ponction échoguidée chez les femelles d'élite, sont mûris et fécondés in vitro et leur développement est assuré en coculture jusqu'au stade blastocyste, moment où ils peuvent être transférés dans des receveuses synchrones.

Le clonage par transfert de noyau permet d'obtenir, à partir d'un seul embryon, plusieurs individus de valeur génétique identique.

Les techniques suivies pour l'obtention d'embryons donneurs devant servir au clonage varient suivant les auteurs:

- a) développement de l'embryon in vivo dans les oviductes de lapine servant d'hôte intermédiaire,
- b) culture embryonnaire in vitro en présence de cellules épithéliales salpingiennes (coculture),
- c) culture embryonnaire in vitro sur milieu renfermant le ou les produits de sécrétion des cellules épithéliales salpingiennes (milieu conditionné).

Notre objectif de départ fut de comparer les résultats obtenus à partir de chacune de ces méthodes et d'utiliser celle qui se montrait la plus fiable. Nous avons fait les constatations suivantes:

- 1) le développement *in vivo*, dans l'oviducte de lapine, fournit des embryons de qualité (17,4% de blastocystes) tant sur le plan du nombre des blastomères ($100,15 \pm 31,5$) que de leur résistance à la congélation,
- 2) en coculture, le pourcentage de blastocystes obtenu s'échelonne entre 10,3 et 29,2% avec un nombre de blastomères sensiblement équivalent à celui obtenu *in vivo* (de $90,8 \pm 31,34$ à $105,15 \pm 22,2$), mais leur résistance à la congélation est moindre,
- 3) en milieu conditionné, le développement est similaire à celui obtenu *in vivo* mais le nombre de blastomères est plus faible ($72,3 \pm 27,9$).

Bien que la qualité des embryons fournis par la méthode *in vivo* fut excellente, nous n'avons pas retenu cette dernière en raison de la lourdeur de son exécution et du nombre finalement assez réduit d'embryons récoltés. Les milieux conditionnés ont également été rejetés en raison de la faible viabilité des embryons produits. Notre choix s'est donc porté sur la technique de la culture *in vitro*, en présence de cellules épithéliales tubaires, tant pour le développement des embryons donneurs que pour celui des embryons reconstitués par clonage.

La mise au point des détails techniques des micromanipulations à porté sur: le moment idéal pour réaliser l'énucléation de l'ovocyte receveur, le type d'embryon donneur, le transfert du blastomère, la nature de l'impulsion électrique à utiliser pour obtenir la fusion des membranes et l'activation ovocytaire.

L'énucléation des ovocytes mûrs (après 24 à 26 heures de MIV) doit comporter l'aspiration du globule polaire et de la portion cytoplasmique

adjacente. Le contrôle de l'énucléation s'opère sous illumination ultraviolette de l'ovocyte, après avoir soumis ce dernier à un colorant fluorescent, le bisBenzimide, qui se fixe sur l'ADN. Seuls les ovocytes réellement énucléés, encore appelés cytoplastes (71,2% des ovocytes micromanipulés), sont replacés, jusqu'au lendemain, dans leur milieu de maturation de manière telle que l'ovocyte soit activé après 44 ± 2 heures. Cette activation est réalisée en soumettant les cytoplastes à un champ électrique créé par une impulsion de 65 Volts durant 50 microsecondes (2,7 kVolts/cm).

Les conditions de micromanipulation et d'activation retenues furent ensuite appliquées à trois types d'embryons donneurs: des embryons produits in vivo et utilisés soit immédiatement, soit après congélation, et des embryons provenant de la coculture et utilisés sans cryopréservation préalable.

Les résultats obtenus furent sensiblement identiques avec les embryons utilisés à l'état frais: $13,1 \pm 7,2\%$ pour ceux produits in vivo, versus $11,5 \pm 9,9\%$ pour ceux produits in vitro. Cette similitude des résultats nous a conduit à n'utiliser pour le clonage que les embryons frais provenant de la coculture. Cette constatation est importante car l'utilisation d'embryons produits in vitro simplifie fortement l'ensemble des manipulations et autorise la réalisation de plusieurs cycles de clonage. Quant à l'utilisation d'embryons ayant subi la cryopréservation, elle s'est révélée très décevante ($2,2 \pm 3,5\%$ de blastocystes). Les lésions cellulaires et membranaires occasionnées par la congélation sont trop importantes d'autant plus que, pour le clonage, ces embryons doivent être cryopréservés au jour 5,5, stade auquel ils sont très fragiles.

Les morulas obtenues suite au premier cycle de clonage ont servi d'embryons donneurs pour un deuxième cycle, encore appelé reclonage. Les résultats obtenus au terme du premier comme du deuxième cycle de clonage furent identiques: $15 \pm 12\%$ de blastocystes dans les deux cas. Il en découle que le potentiel de développement des embryons donneurs n'est

pas affecté par un long séjour in vitro (25 jours de culture, MIV, FIV et développement compris). Il faut, cependant, souligner une grande variabilité dans les résultats. Celle-ci peut s'expliquer soit par la qualité intrinsèque de l'embryon, soit par l'hétérogénéité des cycles cellulaires des blastomères constituant l'embryon. Si l'importance du cycle cellulaire peut être partiellement réduite en utilisant des ovocytes plus âgés et donc moins riches en MPF, il est, par contre, impossible d'agir sur le potentiel de développement de chaque donneur.

A chaque étape de notre travail, des blastocystes ont été transférés, sans cryopréservation préalable, dans des receveuses synchrones de manière à tester leur capacité à induire une gestation et à produire un veau normal. Toutes conditions de transfert confondues, le pourcentage de gestation menée à terme fut de 17,8 et 27,8% à partir, respectivement, de blastocystes du premier et du deuxième cycle. Les résultats furent encore améliorés suite au transfert systématique, chez chaque receveuse, de deux embryons provenant du même clone, à condition de respecter strictement la synchronisation entre le développement des embryons transférés et le cycle œstral de la receveuse. Malgré ces améliorations, le taux de mortalité embryonnaire, après transfert d'embryons clonés reste élevé, cette mortalité survient essentiellement au cours du premier trimestre de la gestation.

Nous avons enregistré la naissance de 7 veaux, dont une paire de jumeaux, suite au transfert de blastocystes issus du premier cycle de clonage et de 5 veaux dont un clone de trois veaux et une paire de jumeaux pour les transferts du second cycle. Si l'on ne tient compte que des transferts synchrones de deux embryons, le pourcentage de naissances obtenu fut respectivement de 21,4 et 20,8%.

Toutes les gestations simples obtenues par transfert d'embryons clonés du premier cycle ont dépassé le terme normal de 6 à 16 jours, soit une moyenne de 9,6 jours. Le poids moyen des nouveau-nés était de 40 Kg. Ces valeurs correspondent à ce qui est normalement observé dans la

race BBB. Lors de transferts d'embryons provenant de clones du deuxième cycle, la durée de la gestation fut allongée de 11 et 12 jours pour le premier clone, et de 2 jours pour les deux receveuses du second clone. Le poids des veaux à la naissance était de 70 Kg pour les deux veaux du premier clone et de 55, de 45 et de 35 Kg pour les trois veaux du deuxième clone. Ces valeurs sont parfaitement normales, alors que d'autres auteurs ont signalé des cas de prolongation de la gestation avec gigantisme. Nous avons contrôlé le caryotype des veaux nés et nous n'avons noté aucune anomalie. Les seules lésions constatées sont localisées au niveau du placenta: œdème, hypertrophie cotylédonnaire et môle hydatiforme. L'étiologie de ces lésions reste à déterminer.

Les 12 veaux nés après transfert d'embryons clonés font partie de 8 clones différents et parmi ceux-ci, 6 sont de sexe mâle. Cette constatation nous a incité à contrôler le sexe des embryons à toutes les étapes de notre travail. Un déséquilibre du sex-ratio en faveur des mâles est observé après FIV. Cette prédominance des mâles est toutefois moins prononcée pour les morulas qui servent d'embryons donneurs pour le transfert de noyau, ce qui peut expliquer que nous n'avons pas constaté de déséquilibre au niveau des familles d'embryons reconstitués. Quant à la prédominance des veaux mâles constatée à la naissance, l'effectif est malheureusement trop restreint pour pouvoir en tirer une conclusion.

Il faut encore signaler qu'aucune différence significative ne fut observée au point de vue du caryotype chez trois groupes d'ovocytes issus de follicules de taille croissante allant de 1 à 13 mm de diamètre. On ne peut donc juger de la qualité de la maturation ovocytaire en ne se référant uniquement à la qualité de la maturation nucléaire.

Pour que le clonage par transfert de noyau puisse devenir un support valable pour la recherche et l'élevage, la technique doit être capable de produire en série des clones constitués d'au moins 5 à 10 unités. Si dans l'état actuel de nos recherches plusieurs étapes de la technique sont parfaitement maîtrisées, de nombreux points restent à améliorer,

particulièrement la maturation cytoplasmique de l'ovocyte et l'impact du cycle cellulaire du noyau donneur.

Des recherches sont également nécessaires en vue de perfectionner la technique de culture des embryons reconstitués. La production d'embryons parfaitement viables est une condition indispensable en vue de permettre la cryopréservation des embryons produits et de réduire le taux important de mortalité embryonnaire.

En outre, il conviendra d'étudier d'une manière approfondie l'impact que peut avoir le clonage sur l'expression de certains gènes impliqués notamment dans le développement fœtal.

Pour terminer, nous pensons devoir étudier l'influence de l'hérédité cytoplasmique (ADN mitochondrial) sur les performances des individus constituant un clone.

Ainsi que nous venons de le voir, si le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine est aujourd'hui devenu une réalité, son emploi comme outil de sélection dans cette espèce exige encore pas mal de perfectionnements.

RESUME



La première partie de ce travail a été consacrée à la production de blastocystes bovins à partir d'ovocytes prélevés sur des ovaires d'abattoirs et ayant été mûris et fécondés in vitro. Trois types de développement ont été testés: soit in vivo dans l'oviducte de lapines pseudogestantes, soit in vitro en présence de cellules épithéliales tubaires (coculture) ou de leurs produits de sécrétion (milieu conditionné). Nous avons opté pour la coculture qui fournit des résultats équivalents ($\pm 29\%$) si pas supérieurs au développement dans l'oviducte de la lapine ($\pm 26\%$), et cela tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. De plus, l'emploi de la lapine comme hôte intermédiaire est lourd d'un point de vue technique. Quant aux milieux conditionnés, ils ont été abandonnés ($\pm 19\%$) car ils fournissent des blastocystes de moindre qualité qui ne supportent ni la congélation, ni les micromanipulations.

Pour réaliser le clonage par transfert de noyau, il a fallu déterminer les conditions optimales de fusion et d'activation qui sont de 65 Volts (2,7 kVolts/cm) pendant 50 microsecondes. Trois types d'embryons donneurs ont été comparés: les embryons produits in vivo et utilisés à frais ou après congélation et les embryons obtenus totalement in vitro. Les résultats démontrent que ces derniers sont tout aussi utilisables que les embryons obtenus in vivo et utilisés à frais. Cette constatation a permis la réalisation du second cycle de clonage, encore appelé reclonage. Aucune diminution du taux des blastocystes entre le clonage et le reclonage (15%) n'a été observée. Ces résultats correspondent à un coefficient de multiplication de l'embryon donneur de 3,5 pour les deux cycles. Il faut noter que les résultats sont très variables d'un essai à l'autre, cette variabilité est sans doute à attribuer d'une part au potentiel de développement intrinsèque de l'ovocyte (seul 30% des ovocytes atteignent le stade blastocyste après FIV) et d'autre part à l'effet encore mal connu du cycle cellulaire du blastomère donneur sur la capacité de ce dernier à subir une reprogrammation.

Le transfert des blastocystes développés in vitro après clonage et reclonage a permis la naissance de douze veaux normaux et des pourcentages de gestation de 35,7 (5/14) et de 33,3% (4/12) pour les premier et deuxième cycles de clonage.

Les contrôles réalisés à chaque étape de la technique ne nous ont pas permis de déceler l'apparition d'anomalie caryotypique ni de perturbation importante du sex-ratio. Seules des lésions placentaires ont été observées, mais aucune explication n'a été avancée quant à leur étiologie.

ANNEXES:

**Composition et fabrication des
milieux**



1. Composition des différentes solutions "stocks" N°:

1) PECS (pro-œstrus cow serum)

Sérum d'une vache récolté la veille de la manifestation des chaleurs. Approximativement 1 litre de sang est récolté en tubes secs de 10 ml au vingtième jour du cycle œstral après vérification de la tonicité utérine. Le sang laissé à coaguler pendant une nuit, est centrifugé une première fois à 1500 g durant 15 minutes. Le surnageant, récolté dans des tubes de 50 ml subit une deuxième centrifugation identique à la première. Le sérum est ensuite décomplémenté au bain-marie, en le chauffant à 56 °C pendant 30 minutes. Le PECS est ensuite conditionné par 1 et 6 ml dans des tubes Falcon de 5 (réf.: 2003) et 50 ml (réf.: 3013A) et conservé au congélateur à -20°C. Il s'utilise à la concentration de 20% pour la fabrication des milieux de maturation et de coculture.

2) STOCK FSH-LH (produite au laboratoire)

Composition: LH (1,0 x NIH-LH-S1); FSH (75 x NIH-FSH-S1).

Fabrication: 50 µg FSH et 500 µg LH par ml dans du liquide physiologique non filtré.

Conservation: répartir par 350 µl dans des tubes Eppendorf et congeler à -20°C.

Utilisation: 10 µl par ml de milieu de maturation (dilution 100 fois).

3) STOCK PYRUVATE (CCT-SIGMA P-3662)

Composition: 10 mg/ml de pyruvate de sodium dans du sérum physiologique stérile.

Fabrication: additionner 500 mg de pyruvate et 450 mg de NaCl CCT dans 50 ml d'eau ultrapure, filtrer sur 0,22µm.

Conservation: répartir par 1 ml et conserver au congélateur; après ouverture, n'est conservé à 4°C que pendant une semaine maximum.

Utilisation : à différentes dilutions dans la maturation, la fécondation et la coculture.

4) STOCK PENICILLINE - STREPTOMYCINE (PS) (GIBCO 600-5145AE)

Composition: 10.000 U/ml de Pénicilline et 10 mg/ml de Streptomycine (isotonique).

Fabrication: introduire 20 ml d'eau ultrapure dans le flacon, filtrer sur 0,22µm et répartir par 1 ml.

Conservation: avant reconstitution, 18 mois à 4°C; après reconstitution, le mélange se conserve au congélateur en cryotubes stériles ou à 4°C pendant une.

Utilisation: à 5 µl/ml dans les milieux de fécondation (TALP) et à 10 µl/ml dans les autres milieux (maturation et coculture).

5) FCS (Fetal calf serum) (SEBAK - ELSCOLAB - Réf.: 30.01.21)

Composition: le FCS est livré congelé, stérile et décomplémenté en flacon de 100 ml. Le FCS est conditionné par 1, 2 et 4 ml dans des tubes Falcon de 5 ml (ref. 2003) et congelé à -20°C. Il s'utilise aux concentrations de 10 à 20% dans le TCM 199 HEPES ou dans du PBS.

6) STOCK ANTIBIOTIQUES - ANTIMYCOTIQUE (PSA) (GIBCO 600-5245AE)

Composition: 10.000 U/ml de Pénicilline, 10 mg/ml de Streptomycine et 25 µg/ml d'Amphotéricine B (isotonique).

Fabrication: introduire 20 ml d'eau ultrapure dans le flacon, filtrer sur 0,22µm et répartir par 1ml.

Conservation: avant reconstitution, 18 mois à 4°C; après reconstitution le mélange se conserve au congélateur en cryotubes stériles.

Utilisation: 10 µl/ml pour le lavage et la culture primaire des cellules d'oviducte.

7) STOCK HEPARINE (CCT-SIGMA H-8514)

Composition: 500 µg/ml d'héparine dans du liquide physiologique ultrapur et stérile.

Fabrication: 5 mg d'héparine dissoute dans 10 ml de liquide physiologique, avec filtration sur 0,22µm.

Conservation: au congélateur à -20°C, en cryotubes contenant 100 µl.

Utilisation: ajouter 40 µl de la solution pour 10 ml d'IVF-TALP de manière à obtenir une concentration de 2 µg d'héparine par ml de milieu de fécondation.

8) STOCKS CaCl₂ 40 mM (CCT-SIGMA C-7902)

Composition: solution à 40 mM de CaCl₂ dans l'eau ultrapure (20 x concentrée).

Fabrication: 588 mg de CaCl₂.2 H₂O dans 100 ml d'eau ultrapure, filtrer sur 0,22 µm.

Conservation : dans 2 flacons 50 ml (Falcon 3013) à 4°C pour maximum 3 mois.

Utilisation: à diluer 20 fois pour la préparation des TALPs (2 mM).

9) STOCK CYTOCHALASINE B (SIGMA C-6762)

Composition: Solution à 10 mg/ml de CCB dans l'éthanol p.a.

Fabrication: injecter 500 µl d'éthanol p.a. dans la flapule contenant 5 mg de cytochalasine B.

Conservation: répartir la solution par 100 µl dans des cryotubes, et les conserver au congélateur à -20°C.

Utilisation: ajouter 7,5 µl de la solution pour 10 ml de PBS (7,5 µg/ml).

10) STOCK HYALURONIDASE (SIGMA H-3506)

Composition: 10 mg/ml d'hyaluronidase dans du liquide physiologique.

Fabrication: 500 mg d'hyaluronidase dans 50 ml de liquide physiologique, filtrer sur 0,22µm.

Conservation: congeler à -20°C par fraction de 0,5 ml, en tube Falcon (réf.: 2003).

Utilisation: porter à 5 ml avec du PBS-FCS sans Ca-Mg (1 mg / ml).

11) STOCK HÖECHST 33342 (bis-benzimide, SIGMA B-2261)

Composition: 1 mg/ml de Hœchst 33342 dans de l'eau ultrapure.

Fabrication: 10 mg de Hœchst dans 10 ml d'eau ultrapure.

Conservation: ne pas filtrer car le colorant reste fixé sur le filtre, conserver le stock à 4°C dans un tube Falcon de 15 ml (réf.: 2096) occulté par une feuille d'aluminium.

Utilisations:

- Pour le contrôle de l'énucléation: mettre 20 µl du stock dans 4 ml de PBS-10%FCS (5µg/ml).

- Pour le comptage des noyaux: mélanger 0,75 ml du stock de citrate de Na avec 0,25 ml d'éthanol p.a. et 10µl du stock de Hœchst.

12) STOCK CITRATE DE SODIUM (SIGMA C-5920)

Composition: 2,3% de citrate de sodium dans de l'eau ultrapure.

Fabrication: 1150 mg de citrate de Na dans 50 ml d'eau ultrapure.

Conservation: filtrer sur 0,22µm et stocker dans un flacon Falcon de 50 ml (réf.: 3013A).

Utilisations: Lors du comptage des noyaux: mélanger 0,75 ml du stock de Citrate de Na avec 0,25 ml d'éthanol p.a. et 10µl du stock de Hœchst.

2. Composition des milieux

A. Milieux nécessaires à la maturation des COC

1) Liquide physiologique destiné à la récolte et au lavage des ovaires

Composition:

NaCl	90 g
Sulfate de kanamycine	500 mg
H ₂ O ultrapure	ad 10 litres

Conservation: à température ambiante pendant maximum 15 jours.

Utilisation: tel quel après préchauffage au bain-marie à 39 °C.

2) TCM 199 HEPES BSA pour le lavage des COC

Composition:

199 HEPES (GIBCO 041-02350 M)	250 ml
BSA	750 mg
Gentamicine	12,5 mg
Pyruvate	7,5 mg

Filtrer sur 0,22 μ m et conserver à 4°C pendant 1 mois.

Utilisation: prêt à l'emploi après préchauffage à 39°C.

3) TCM 199 PECS pour la maturation des COC

Composition: TCM 199 (SIGMA M-4530) additionné de:

PECS	20%
LH	5 mg/L
FSH	0,5 mg/L
Pyruvate	30 mg/L (0,27 mM)
Pénicilline	100.000 U/L
Streptomycine	100 mg/L

Fabrication en deux temps:

- milieu intermédiaire:

PECS (solution stock n°1)	6 ml
TCM 199 bicarbonaté	24 ml
Stock FSH-LH (solution stock n°2)	300 μ l

Filtrer sur 0,22 μ m et conserver une semaine à l'incubateur.

- milieu complet fabriqué au jour le jour, sans filtration:

milieu intermédiaire	4,935 ml
Stock pyruvate (solution stock n°3)	15 μ l
Stock PS (solution stock n°4)	50 μ l

Utilisation: prêt à l'emploi après équilibration à l'incubateur.

B. Milieux de fécondation: les TALPs

Les milieux de FIV sont au nombre de trois. Ils sont appelés TALP car ils sont dérivés du milieu de Tyrode additionné d'Albumine, de Lactate et de Pyruvate. Le milieu IVF-TALP sert à la fécondation des COC proprement dite, alors que le SP-TALP sert au lavage des spermatozoïdes et le H-TALP (H=HEPES) à celui des COC avant la fécondation.

Composition des TALPS:

	<u>H-TALP</u> (mM-mg/L)	<u>SP-TALP</u> (mM-mg/L)	<u>IVF-TALP</u> (mM-mg/L)
NaCl	128-7480	94-5693	113-6604
KCl	3,16-236	3,1-231	3,16-236
NaH ₂ PO ₄	0,35-42	0,35-42	0,35-42
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,5-102	0,5-102	0,5-102
CaCl ₂ .2 H ₂ O	2-294	2-294	2-294
Rouge de Phénol	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
NaHCO ₃	2-168	25-2100	25-2100
Lactate de sodium	10-1121	21,6-2421	10-1121
HEPES	10-2383	10-2383	/
Pyruvate de sodium	0,2-22	1-110	0,2-22
BSA Fraction V	0,3%-3000	0,6%-6000	/
BSA Fatty Acid Free	/	/	0,6%-6000
Héparine	/	/	2 µg/ml
Pénicilline	50 U/ml	50 U/ml	50 U/ml
Streptomycine	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml

Fabrication:

Les milieux TALPs sont fabriqués en trois étapes: les milieux de base, les milieux de conservation intermédiaires et les milieux complets à utiliser dans les 24 heures.

- milieux de base:

	<u>H-TALP base</u>	<u>SP-TALP base</u>	<u>IVF-TALP base</u>
NaCl	7480 mg	5493 mg	6604 mg
KCl	236 mg	231 mg	236 mg
NaH ₂ PO ₄	42 mg	42 mg	42 mg
MgCl ₂ .6 H ₂ O	102 mg	102 mg	102 mg
Rouge de Phénol	10 mg	10 mg	10 mg
Eau ultrapure q.s.	100 ml	100 ml	100 ml

Filter sur 0,22µm, et et conserver pendant 3 mois à 4°C.

- Milieux intermédiaires:

	<u>H-TALP</u>	<u>SP-TALP</u>	<u>IVF-TALP</u>
Eau ultrapure	50 ml	50 ml	50 ml
Base correspondante	10 ml	10 ml	10 ml
CaCl ₂ 40 mM	5 ml	5 ml	5 ml
Bicar 7,5%	244 µl	2,8 ml	2,8 ml
HEPES 1M	1 ml	1 ml	0
Lactate 60%	146 µl	315 µl	146 µl
BSA fraction V	300 mg	600 mg	/
BSA FAF	/	/	600 mg
Eau ultrapure q.s.	100 ml	100 ml	100 ml

Vérifier l'osmolarité, ajuster l'H-TALP à pH 7,4 par du NaOH 1N, gazer l'IVF-TALP avec le mélange 5% CO₂ dans l'air.

Filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C pendant deux semaines.

- Milieux complets:

	<u>H-TALP</u>	<u>SP-TALP</u>	<u>IVF-TALP</u>
Stock pyruvate (solution stock n°3)	22 µl	110 µl	22 µl
Stock PS (solution stock n°4)	50 µl	50 µl	50 µl
Stock Héparine (solution stock n°7)	0	0	40 µl
Milieux intermédiaires q.s.	10 ml	10 ml	10 ml

Utilisation: prêts à l'emploi après équilibration à 39°C, dans l'étuve CO₂ pour les SP-TALP et IVF-TALP seulement.

C. Milieux nécessaires au développement des embryons

1) Liquide physiologique (voir composition en A)

Ce liquide physiologique est destiné à la récolte, au lavage ainsi qu'au transport des oviductes.

2) PBS

Le PBS destiné au lavage des cellules d'oviducte est fabriqué au laboratoire en plusieurs étapes:

a) Fabrication du PBS normal ou exempt de Ca et de Mg:

Composition: avec ou sans Ca et Mg:

NaCl	8000 mg/L
Na ₂ HPO ₄	1150 mg/L
KCl	200 mg/L
KH ₂ PO ₄	200 mg/L
(MgCl ₂ .6 H ₂ O	100 mg/L)
(CaCl ₂	100 mg/L)
Glucose	1000 mg/L
Pyruvate de Na	36 mg/L
Sulfate de Kanamycine	25 mg/L
Rouge de phénol	5 mg/L

Fabrication: diluer le calcium d'abord dans 50 ml d'eau, puis l'incorporer lentement et sous agitation.

Conservation: pendant 6 mois à 4°C.

b) Addition du FCS au PBS

Milieu de base utilisé notamment lors de la congélation, de la décongélation, du clonage et des lavages des cellules d'oviducte.

Composition: PBS additionné de 10% de FCS suivi d'une filtration sur 0,22µm.

Conservation: 1 mois à 4°C.

c) Addition du Stock PSA (solution stock n°6) au PBS-10% FCS pour le lavage des cellules épithéliales

Fabrication:

PBS-FCS	148,5 ml
Stock PSA (solution stock n°6)	1,5 ml

Conservation: pendant 1 mois à 4°C.

Utilisation: tel quel à 39°C.

3) TCM 199 PECS pour la préculture des cellules tubaires

Composition: TCM 199 (SIGMA M-4530) additionné de :

PECS (solution stock n°1)	20%
Pénicilline	100.000 U/L
Streptomycine	100 mg/L
Amphotéricine B	1 mg/L
pyruvate de sodium	30 mg/L (0,27 mM)

Fabrication en deux temps:

- un milieu intermédiaire:

PECS (solution stock n°1)	6 ml
TCM 199 bicarbonaté	24 ml

Filtrer sur 0,22µm, et conserver une semaine à l'incubateur.

- un milieu complet a utiliser extemporanément:

Stock pyruvate (solution stock n°3)	45 µl
Stock PSA (solution stock n°6)	150 µl
Milieu intermédiaire q.s.	15 ml

4) Ménézo B2 pour la coculture des embryons en présence des cellules

Composition: Ménézo B2 (IMV-Cassou) additionné de:

PECS (solution stock n°1)	20%
Pénicilline	100.000 U/L
Streptomycine	100 mg/L
Pyruvate de sodium	30 mg/L (0,27 mM)

Fabrication en deux temps:

- un milieu intermédiaire:

PECS (solution stock n°1)	1 ml
Ménézo B2	4 ml

Filtrer sur 0,22µm, et conserver deux semaines à l'incubateur.

- milieu complet à utiliser extemporanément:

Ménézo B2-PECS	987 µl
Stock pyruvate (solution stock n°3)	3 µl
Stock PS (solution stock n°4)	10 µl

D. Milieux spécifiques aux manipulations du clonage

Cinq milieux sont préparés la veille ou le matin de la micromanipulation. Tous ces milieux, excepté l'hyaluronidase, sont employés à température ambiante.

1) Milieu de décolorisation des COC:

Composition: hyaluronidase à 1% dans du PBS sans calcium ni magnésium.

Fabrication: 4,5 ml de PBS sans Ca ni Mg plus 0,5 ml d'hyaluronidase stock congelée (solution stock n°10); filtrer sur 0,22µm.

Utilisation: tel quel après préchauffage au bain-marie à 39 °C.

2) Milieu d'énucléation des ovocytes:

Composition: PBS + 10% FCS + 7,5 µg/ml de Cytochalasine B.

Fabrication: 10 ml PBS 10% FCS + 7,5 µl de stock CCB (solution stock n°9); filtrer sur 0,22µm.

Utilisation: tel quel à température ambiante.

3) Milieu de contrôle de l'énucléation:

Composition: PBS + 10% FCS + 5 µg/ml de colorant Hœchst 33342.

Fabrication: 4 ml de PBS-10% FCS + 20 µl du stock Hœchst (solution stock n°11); ne pas filtrer car le filtre retient le colorant.

Utilisation: tel quel à température ambiante.

4) Milieu d'injection des blastomères:

Composition: PBS sans calcium ni magnésium + 10% de FCS et 7,5 µg/ml de Cytochalasine B.

Fabrication: 9 ml de PBS sans calcium ni magnésium + 1 ml de FCS + 7,5 µl de stock CCB (solution stock n°9); filtrer sur 0,22µm.

Utilisation: tel quel à température ambiante.

5) Milieu d'électrofusion:

Composition: solution à 50 mg/ml de mannitol + 0,01 mM en CaCl₂ et 0,1 mM en MgSO₄.

Fabrication: 2500 mg de mannitol + 50 µl d'une solution à 1,5 mg/ml de CaCl₂.2 H₂O + 0,5 ml d'une solution à 2,5 mg/ml de MgSO₄.7 H₂O et filtrer sur 0,22µm.

Utilisation: tel quel à température ambiante.

3. Références et caractéristiques des produits utilisés:

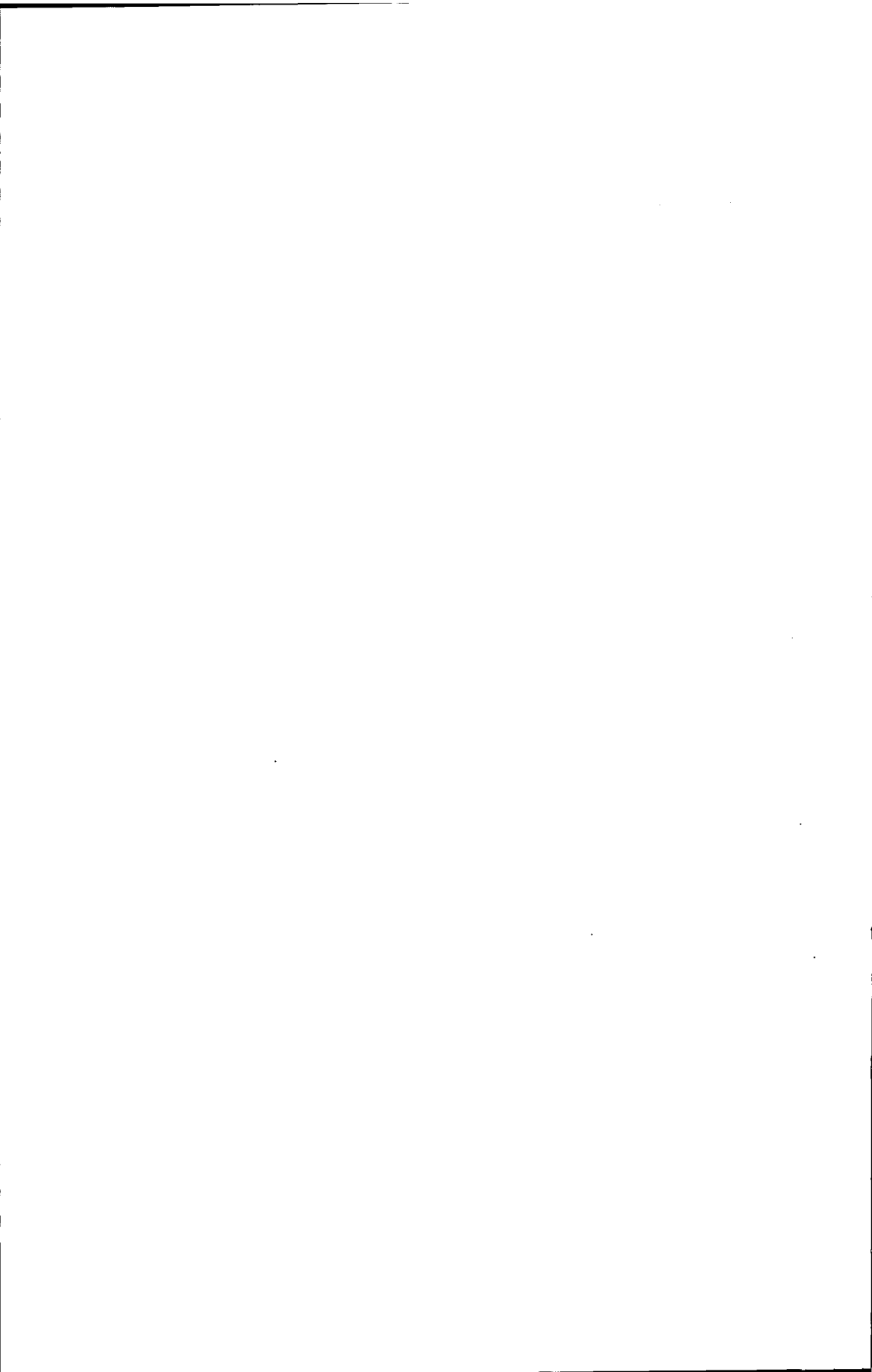
Noms	Marques	Références	Puretés	Conser.
Albumine, Bovine, Fraction V	SIGMA	A-9647	96-99%	+4°C
" , " , Fatty Acid-Free	BOEHRINGER	1081489	-	+4°C
Antibiotiques-Péni-Strepto (lyoph.)	GIBCO	600-5145AE	-	+4°C
Antibiotiques-Antimycotique (lyoph.)	GIBCO	600-5245AE	-	+4°C
Bicarbonate de Na 7,5%	GIBCO	043-05080D	7,5%	+20°C
CaCl ₂	SIGMA	C-2661	CCT	+20°C
CaCl ₂ .2 H ₂ O	SIGMA	C-7902	CCT	+20°C
Cytochalasine B	SIGMA	C-6762	-	-20°C
Dioxyde de carbone	AIR LIQUIDE	N25 B50	99,5%	+20°C
Dioxyde de carbone dans l'air	AIR LIQUIDE	DOC 45 R B50	5,0%	+20°C
Ethanol p.a.	CARLO ERBA	414608	99,7%	+20°C
F.C.S.	SEBAK	30.01.21	-	-20°C
Fluorinert FC-77	SIGMA	F-4758	-	+20°C
Gentamicine	SIGMA	G-1264	CCT	+4°C
Glucose	SIGMA	G-7021	CCT	+20°C
Glycérol	ANALAR	10118	99,5%	+20°C
Héparine de Na (176 U/mg)	SIGMA	H-8514	CCT	+20°C
HEPES Buffer 1 M	SIGMA	H-0887	CCT 1M	+4°C
Histomount	NAT. DIAGS.	HS-103	-	4°C
Hoechst N° 33342	SIGMA	B-2261	-	-20°C
Huile Minerale (light)	SIGMA	M-3516	-	+20°C
Hyaluronidase	SIGMA	H-3506	290 U/mg	-20°C
Isopropanol technique	VEL	90105	Technique	+20°C
KCl	SIGMA	P-5405	CCT	+20°C
KH ₂ PO ₄	SIGMA	P-5655	CCT	+20°C
L-Lactate de calcium.±2 H ₂ O	SIGMA	L-4388	CCT	4°C
DL-Lactate de sodium(1,3) (98 %)	SIGMA	L-4263	CCT	4°C
Mannitol	SIGMA	M-1902	CCT	+20°C
MILIEU INRA Ménézo B2	IMV CASSOU		-	4°C
Méthanol	UCB	4576	Tout pur	+20°C
MgCl ₂ .6 H ₂ O	SIGMA	M-2393	CCT	+20°C
MgSO ₄ .7 H ₂ O	SIGMA	M-7774	CCT	+20°C

Noms	Marques	Références	Puretés	Conser.
MILIEU 199 bicarbonate	SIGMA	M-4530	-	4°C
MILIEU 199 Hepes	GIBCO	041-02350 M	-	4°C
NaCl	SIGMA	S-5886	CCT	+20°C
NaCl (physio)	UCB	8605	Tout pur	+20°C
NaHCO ₃	SIGMA	S-4019	CCT	+20°C
NaH ₂ PO ₄	SIGMA	S-5011	CCT	+20°C
Na ₂ HPO ₄	SIGMA	S-5136	CCT	+20°C
NaOH 1 N	SIGMA	S-2770	CCR 1 N	4°C
PBS (10 x)	GIBCO	042-04080H	10 x []	+20°C
Percoll	PHARMACIA	17-0891-01	Stérile	+20°C
Pyruvate de sodium	SIGMA	P-3662	CCT	4°C
Rouge de phénol	SIGMA	P-5530	CCT	+20°C
Sigmacote	SIGMA	SL-2	-	4°C
Sucrose	SIGMA	S-1888	CCT	+20°C
Sulfate de Kanamycine	SIGMA	K-1377	CCT	+20°C
Sulfate de Kanamycine (physio)	GIBCO	860-1815 IL	775 µg/mg	+20°C

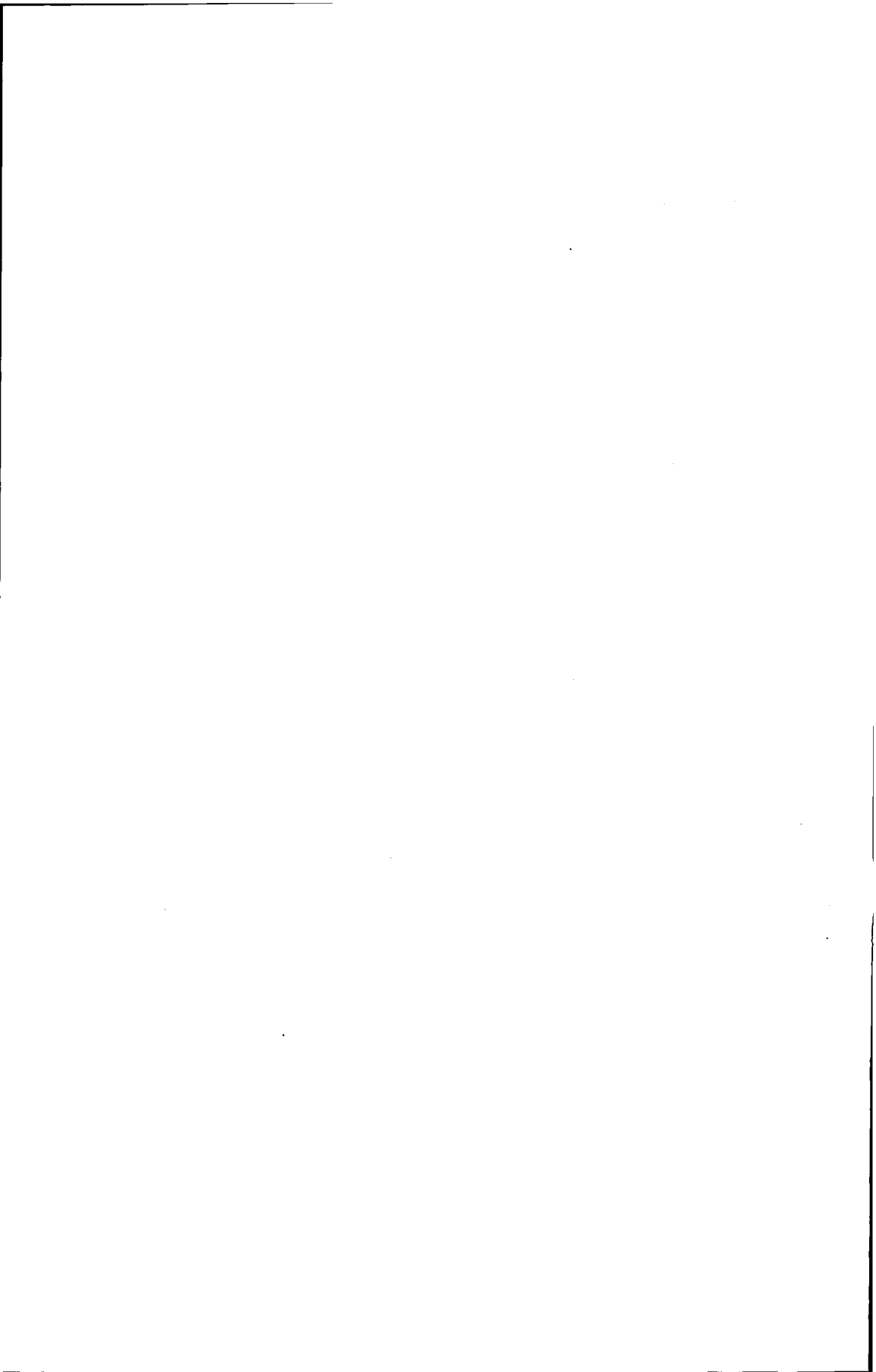
Labels de qualité des produits destinés à la culture de cellules:

CCT: Cell Culture Tested

CCR: Cell Culture Reagent.



BIBLIOGRAPHIE



Avery B., Madison V., Greve T. Sex and development in bovine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology*, **3** 5, 953-963, 1991.

Avery B., Jörgense C.B., Madison V., Greve T. Morphological development and sex of bovine in vitro fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **3** 2, 265-270, 1992.

Bachvarova R., De Leon V., Johnson A., Kaplan G., Paynton P.V. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.*, **108**, 325-331, 1985.

Barnes F.L., Robl J.M., First N.L. Nuclear transplantation in mouse embryos: assessment of nuclear function. *Biol. Reprod.*, **3** 6, 1267-1274, 1987.

Barnes F.L., Eyestone W.H. Early cleavage and maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*, **3** 3, 141-152, 1990.

Barnes F.L., Collas P., Powell R., King W.A., Westhusin M., Shepherd D. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol. Reprod. and Dev.*, **3** 6, 33-41, 1993a.

Barnes F.L., Endebrock M., Looney C., Powell R., Westhusin M., Bondioli K. Embryo cloning in cattle: the use of in vitro matured oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **9** 7, 317-320, 1993b.

Berridge M.J., Galione A. Cytosolic calcium oscillators. *FASEB*, **2**, 3074-3082, 1982.

Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol phosphate in cellular signaling. *Nature*, **341**, 197-205, 1989.

Berridge M.J. Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9583-9586, 1990.

Bondioli K.R., Westusin M.E., Looney C.R. Production of identical offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, **3** 3, 165-174, 1990.

Bondioli K.R. Nuclear transfer in cattle. *Proc. Int Symposium Anim. Biotech.*, Oct. 1991, Kyoto Japan.

Bondioli K.R. Commercial cloning of cattle by nuclear transfer. *In Symposium on cloning mammals by nuclear transplantation*. Ed. Seidel G.E.Jr., Colorado State University, Fort Collins, 1992.

Briggs R., King T.J. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **38**, 455-463, 1952.

Briggs R. Genetics of cell type determination. *In Cell interaction in differentiation*, 23-44. Eds L. Saxen, L. Weiss. Academic Press, New York, 1977.

Brun R.B. Developmental capacities of *Xenopus* eggs, provided with erythrocyte or erythroblast nuclei from adults. *Devl. Biol.*, **65**, 271-289, 1978.

Busa W.B., Nuccitelli R. An elevated free cytosolic calcium wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus Laevis*. *Devl. Biol.*, **100**, 1325-1329, 1985.

Camous S., Kopecny V., Fléchon J.E. Autoradiographic detection of the earliest stage of (3H)-uridine incorporation. *Biol. Cell*, **58**, 195-200, 1986.

Campbell K.H.S., Ritchie W.A., Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implication for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.*, **49**, 933-942, 1993.

Campbell K.H.S., Loi P., Cappai P., Wilmut I. Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol. Reprod.*, **50**, 1385-1393, 1994.

Clement-Sengewald A., Palma G.A., Berg U., Brem G. Comparison between in vitro produced and in vivo flushed donor embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology*, **37**, 196, 1992.

Collas P. The oocyte as a recipient cell for nuclear transplantation in the rabbit. *Mémoire de fin d'études*, 46p, 1989.

Collas P., Robl J.M. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol. Reprod.*, **43**, 877-884, 1990.

Collas P., Robl J.M. Development of rabbit nuclear transplant embryos from morula and blastocyst stage donor nuclei. *Theriogenology*, **35**, 190, 1991a.

Collas P., Robl J.M. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, **45**, 455-465, 1991b.

Collas P., Balise J.J., Robl J.M. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, **46**, 492-500, 1992.

Crosby I.M., Gandolfi F., Moor R.M. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. fertil.*, **82**, 769-775, 1988.

Cuthbertson K.S.R., Whittingham D.G., Cobbold B.H. Free calcium increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature*, **294**, 754-757, 1981.

Czolowska R., Modlinski J.A., Tarkowski A.K. Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocyte. *J. Cell Sci.*, **69**, 19-34, 1984.

Dale B., De Felice L.J., Ehrenstein G. Injection of a soluble sperm extract into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia*, **41**, 1068-1070, 1985.

DiBerardino M.A., Hoffner N.J. Origin of chromosomal abnormalities in nuclear transplants - A reevaluation of nuclear differentiation and nuclear equivalence in amphibians. *Devl. Biol.*, 2 3, 185-209, 1970.

DiBerardino M.A., Hoffner N.J. Development and chromosomal constitution of nuclear transplants derived from male germ cells. *J. Exp. Zool.*, 176, 61-78, 1971.

Dufour E., Marquant-Le Guienne B., Thuard J.M., Esposito L., Thibier M. Sex related differential development rate of in vitro produced bovine embryos. 10e Réunion AETE, Lyon, 9-10 septembre 1994.

Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Beckers J.F., Ectors F. Obtention de blastocystes après maturation et fécondation in vitro d'ovocytes de bovin: premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 132, 517-519, 1988.

Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Delval A., Beckers J.F., Ectors F. Maturation et fécondation in vitro chez les bovins: naissance d'un veau. *Ann. Méd. Vét.*, 133, 435-436, 1989.

Ectors F.J., Thonon F., Delval A., Fontes R.S., Touati K., Beckers J.F., Ectors F. Comparison between culture of bovine embryos in vitro versus development in rabbit oviducts and in vivo. *Liv. Prod. Sci.*, 3 6, 29-34, 1993a.

Ectors F.J., Delval A., Touati K., Thonon F., Beckers J.F., Ectors F. Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine: premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 137, 427-431, 1993b.

Ectors F.J., Delval A., Touati K., Thonon F., Beckers J.F., Ectors F. Clonage par greffe de blastomère: naissance du premier veau. *Ann. Méd. Vét.*, 137, 573-574, 1993c.

Ectors F.J., Delval A., Smith L.C., Touati K., Beckers J.F., Ectors F. First and second cycle nuclear transfer in cattle: comparison of efficiency in embryo development and ongoing pregnancies. *Theriogenology*, 4 3, 204, 1995a (abstract).

Ectors F.J., Koulischer L., Jamar M., Herens C., Verloes A., Remy B., Beckers J-F. Cytogenetic study of bovine oocytes matured in vitro. Accepted in *Theriogenology*, 1995b.

Ectors F.J., Delval A., Smith L.C., Touati K., Remy B., Beckers J-F., Ectors F. Development potential of reconstructed bovine embryos produced in first and second cycle of nuclear transfer. Soumis à *Theriogenology*, 1995.

Ellinwood W.E., Nett T.M., Niswender G.D. Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. Prostaglandin secretion by the endometrium in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.*, 2 1, 845-856, 1979.

Eyestone W.H., First N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 8 5, 715-720, 1989.

Fisher R.A. On the interpretation of chi-square from contingency tables, and the calculation of P. *J.R. Stat. Soc.*, **8** 5, 87-94, 1922.

First N.L., Prather R.S. Production of embryos by oocyte cytoplasm-blastomere fusion in domestic animals. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* **4** 3, 245-254, 1991.

Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molec. Reprod. Dev.*, **2** 6, 40-46, 1990.

Fukui Y., Sawai K., Furudate M., Sato N., Iwazumi Y., Ohsaki K. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, **3** 3, 357-362, 1992.

Gallien L. La greffe nucléaire chez les amphibiens. *Ann. Biol.*, **5** - 6, 285, 1966.

Gandolfi F., Moor R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.*, **8** 1, 23-28, 1987.

Gandolfi F., T.A.L. Brevini, Moor R.M. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* **3** 8, 107-115, 1989.

Gerhart J., Wu M., Kirschner M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus Laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.*, **9** 8, 1247-1255, 1984.

Grobet L., Schwerts A., Charlier C., Marcq F., Ectors F.J., Touati K., Hanset R. Le sexage d'embryons bovins par la technique de l'amplification en chaîne par la polymérase (ACP) d'une séquence Y-spécifique bovine. *Ann. Méd. Vét.*, **13** 6, 119-124, 1992.

Gurdon J.B. The genome in specialized cells as revealed by nuclear transplantation in amphibia. *In* The cell nucleus, vol.1. Eds. H. Bush, 471-488. Academic Press, New York, 1974.

Gurdon J.B., Laskey R.A., Reeves O.R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **3** 4, 93-112, 1975.

Heyman Y., Camous S., Fevre J., Meziou W., Martal J. Maintenance of corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles in cyclic cows and ewes. *J. Reprod. Fertil.*, **7** 0, 533-540, 1984.

Heyman Y., Chesne P., Renard JP. Reprogrammation complète de noyaux embryonnaires congelés après transfert nucléaire chez le lapin. *C.R. Acad. Sci., Série III*, 321-326, 1990.

Heyman Y., Chesné P., Rao V.H., Marchal J., Camous S., Renard JP. Gestational profile of recipient heifers following transfer of in vitro produced cloned blastocyst. 8e Réunion AETE 11-12 sept 1992 Lyon: Mérieux éd, 164, 1992a.

Heyman Y., Rao V.H., Chesne P., Renard J.P. Bovine nuclear transfer: development is influenced by aged of the recipient oocyte. 12th International Congress on Animal Reproduction, 688-690. The Hague, 23-27 August 1992b.

Heyman Y., Chesne P., Lebourhis D., Renard J.P. Survival of bovine nuclear transfer embryos. 9^e réunion AETE, 210. Lyon, 10-11 September 1993.

Heyman Y., Chesné P., Lebourhis D., Peynot N. J., Renard JP. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: in vivo versus in vitro. *Theriogenology*, 42, 695-702, 1994.

Hogan B., Costantitni F., Lacy E. in "Manipulating the mouse embryo", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 332p, 1986.

Hyttel P., Xu K.P., Smith S., Callesen H. and Greve T. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. *Anat. Embryol.*, 176, 35-40, 1987.

Hyttel P. Oocyte maturation and fertilization in cattle, Thèse, 118p, 1988.

Jagiello G.M., Miller W.A., Ducayen M.B., Lin J.S. Chiasma frequency and disjunctional behavior of ewe and cow oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.*, 10, 354-363, 1974.

Kanka J., Fulka J. Jr, Fulka J., Petr J. Nuclear transplantation in bovine embryo: fine structural and autoradiographic studies. *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 110-116, 1991.

Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip Th.A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 305-310, 1990.

Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip Th.A.M. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 271-275, 1991.

Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Dieleman S.J., Kruip Th.A.M. The influence of the preovulatory LH peak on protein synthesis and phosphorylation in bovine oocytes from follicles of different size and quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 29, 133-143, 1992.

Keefer C.L., Stice S.L., Matthews D.L. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.*, 50, 935-939, 1994.

King T.J. Nuclear transplantation in amphibia. *Methods Cell Biol.*, 2, 1, 1966.

Kline D., Kline J.T. Calcium oscillations, exocytosis, and cell cycle activation in mouse egg. SSR 24th Annual meeting, July 29-31, University of British Columbia, Vancouver, 380, 1991.

Koulischer L., Ectors F.J., Jammam M., Herens C., Beckers J.F. Chromosome studies of bovine oocytes matured in vitro. accepted for oral presentation in VIII World Congress on In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, Kyoto, 15 may 1993.

Lai A., Erickson H.P., Rousseau E., Liu Q.Y., Meissner G. Purification and reconstitution of calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, **331**, 315-319, 1988.

Laskey R.A., Gurdon J.B. genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cells. *Nature*, **228**, 332-358, 1970.

Leibo S.P., Loskutoff N.M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, **39**, 81-94, 1993.

Liebfried-Rutledge M.L., Northey D.L., Nuttleman P.R., First N.L. Processing of donated nucleus and timing of post-activation events differ between recipient oocytes 24 or 42 hours of age. *Theriogenology*, **37**, 244, 1992.

Loeb J. Über eine einfache methode, zwei oder mehr zusammengewachsene embryonen aus einem ei hervorzubringen. *Pflügers Arch.*, **55**, 525-530, 1894.

Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M.P., Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **37**, 48-53, 1994.

Mac Avoy J.W., Dixon R.E., Marshall J.A. Effects of differences in mitotic activity, stage of cell cycle and degree of specialization of donor cells of nuclear transplantation in *Xenopus Laevis*. *Devl. Biol.*, **45**, 330-352, 1975.

Mac Grath J., Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, **220**, 1300-1302, 1983.

Mac Grath J., Solter D. Maternal Thp lethality in the mouse is a nuclear, not cytoplasmic defect. *Nature*, **308**, 550-551, 1984.

Mac Kinnell R.G. Intraspecific nuclear transplantation in frogs. *J. Heredit.*, **53**, 199, 1962.

Mac Kinnell R.G. Cloning, nuclear transplantation in amphibia, University of Minneapolis Press, Minneapolis, 1978.

Martal J., Lacroix M.C., Lourdes C., Saunier M., Wintenberger-Torres S. Trophoblastin, an antilutheolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, **56**, 63-73, 1979.

Martal J., Charlier M., Camous S., Fevre J., Heyman Y. Origin of embryonic signals allowing the establishment of pregnancy corpus luteum in ruminants. *Proc. 10e C. Int. of An. Rep. and A.I.*, Urbana, 509, 1984.

Massip A., Van der Zwalmen P., Mulnard J., Zwijsen W. Atypical hatching of a cow blastocyst leading to separation of complete twin half blastocysts. *Vet. Rec.*, 112, 301, 1983.

Ménézo Y., Renard J-P. La vie de l'œuf avant l'implantation. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme", 299-314. Eds Ellipse INRA, Paris, 1991.

Minamihashi A., Watson A.J., Watson P.H., Church R.B., Schultz G.A. Bovine parthenogenetic blastocysts following in vitro maturation and oocyte activation with ethanol. *Theriogenology*, 40, 63-76, 1993.

Miyazaki S., Hashimoto N., Yoshimoto Y., Kishimoto T., Igusa Y., Hiramoto Y. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Devl. Biol.*, 118, 259-267, 1986.

Miyazaki S. Inositol 1,4,5, triphosphate induce calcium release and nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in goldenhamster eggs. *J. Cell. Biol.*, 106, 345-353, 1988.

Miyazaki S. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell. Calcium*. 12, 205-216, 1991.

Mochizuki H., Fukui Y., Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 36, 973-986, 1991.

Moor R.M., Trounson A.O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent development capacity. *J. Reprod. Fertil.*, 49, 101-109, 1977.

Murray A.W., Kirschner M.W. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, 246, 614-621, 1989.

Norberg H.S. Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo: cleavage and early blastocyst stages. *A. Anat. EntstGesch*, 143, 45-114, 1973.

Orr N.H., DiBerardino M.A., McKinnel R.G. The genome of frog erythrocytes displays centuplicates replications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 1369-1373, 1986.

Ozil J.P. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109, 117-127, 1990.

Ozil J.P., Swann K. Signaux calcium et activation de l'œuf. *Contracept. Fertil. Sex.*, 20, 886-891, 1992.

Parrish J.J., Kim C.I., Bae I.H. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 38, 277-296, 1992.

Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, **31**, 63-67, 1992.

Piko L. Clegg K. Quantitative changes in total RNA, total poly(A) and ribosomes in early mouse embryos. *Dev. Biol.* **89**, 362-378, 1982.

Prather R.S., Barnes F.L., Sims M.M., Robl J.M., Eyestone M.H., First N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, **37**, 859-866, 1987.

Prather R.S., Sims M.M., First N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, **41**, 414-418, 1989.

Prather R.S., Sims M.M., First N.L. Nuclear transplantation in pig embryo: nuclear swelling. *J. exp. Zool.*, **225**, 355-358, 1990.

Prather R.S., Stumpf T.T., Richards L.F. Reprogramming the nucleus and synchronizing it with the cytoplasm. *Proceedings of the symposium on cloning mammals by nuclear transplantation* 26-28, Fort Collins, 15 Janvier 1992.

Prochazka R., Durnford R., Fiser P.S., Marcus G.J. Parthenogenetic development of activated in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*, **39**, 1025-1032, 1993.

Rabahi F., Monniaux D., Pisselet C., Chupin D., Durand P. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis of bovine follicular cells during the preovulatory period. *Mol. Reprod. Dev.*, **30**, 265-274, 1991.

Rao V.H., Chesne P., Renard J.P., Heyman Y. Influence of age of in vitro matured oocytes and electrical stimulations on the development of cattle nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, **39**, 292, 1993.

Renard J.P., Heyman Y. La multiplication par clonage: un nouvel outil pour la sélection animale. *Cahiers Agricultures*, **1**, 309-316, 1992.

Robl J.M., Gilligan B., Crister E.S., First N.L. Nuclear transplantation in mouse embryos: assessment of recipient cell stage. *Biol. Reprod.*, **34**, 733-739, 1986.

Rodell M. The role of hormone receptor and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*, **284**, 17, 1980.

Schultz G., Tucker E.B. "Protein synthesis and gene expression in preimplantation embryo" in :Johnson M. Ed., *Development in mammals*, North Holland Publ. Compagny, The Hague, 69-97, 1977.

Sims M.M., First N.L. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells. *Theriogenology*, **39**, 313, 1993.

Sirard M.A., Bilodeau S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biol. Reprod.*, **43**, 777-783, 1990.

Smith L.C., Wilmut I., Hunter R.H.F. Influence of cell cycle stage at nuclear transplantation on the development in vitro of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, **84**, 619-624, 1988.

Smith L.C., Wilmut I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryo after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.*, **40**, 1027-1035, 1989.

Smith L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **99**, 39-44, 1993.

Solter D., Aronson J., Gilbert S.F., McGrath J. Nuclear transfer in mouse embryos: activation of the embryonic genome. *In* Molecular biology of development, vol. V, 45-50. 50th Symp. Quant. Biol. Cold Spring Harbour, New York, 1986.

Solter D. Inertia of the embryonic genome in mammals. *Trends Genet.*, **3**, 23-27, 1987.

Spemann H. Embryonic development and induction New Haven, Yale University Press, London, 401, 1938.

Steinhart R.A., Epel D. Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, **71**, 1915-1919, 1974.

Stice S.L., Robl J.M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, **39**, 657-664, 1988.

Stice S.L., Robl J.M. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. and Dev.*, **25**, 272-280, 1989.

Stice S.L., Keefer C.L. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.*, **48**, 715-719, 1993.

Surani M.A., Barton S.C., Norris M.L. Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos: an analysis of mammalian development. *Biol. Reprod.*, **36**, 1-16, 1987.

Swann K., Ciapa B., Whittaker M.J. Cellular messengers and sea-urchin egg activation. *In* "The molecular biology of invertebrate development" Ed. O'Connor D. Alan R. Liss, New York, 1987.

Swann K., Igusa Y., Miyazaki S.I. Evidence for an inhibitory effect of protein kinase c on G-protein mediated repetitive calcium transients in hamster eggs. *EMBO J.*, **8**, 3711-3718, 1989.

Swann K. Acytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, **110**, 1295-1302, 1990.

Swann K., Whittaker M.J. Second messengers at fertilization in sea-urchin eggs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **42**, 141-153, 1990.

Takano H., Koyama K., Kozai C., Kato Y., Tsunoda Y. Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos in vitro. *Theriogenology*, **39**, 909-917, 1993.

Tan S.J., Lu K.H. Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology*, **33**, 335, 1990.

Tarkowski A.K., Rossant J. Haploïd mouse blastocysts developed from bisected zygotes. *Nature*, **259**, 663-665, 1976.

Touati K., Ectors F. Congélation de demi-embryons par la méthode au glycérol-sucrose et transfert direct: premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, **135**, 287-289, 1991.

Touati K. Contribution à l'étude de la production et de la cryopréservation d'embryons et de demi-embryons dans l'espèce bovine. Thèse, 106p, 1993.

Tsunoda Y., Yasui T., Shioda Y., Nakamura K., Uchida T. Sugie T. Full term development of mouse blastomere transplanted into enucleated two-cell embryos. *J. Exp. Zool.*, **242**, 147-151, 1987.

Tsunoda Y., Shioda Y., Onodera M., Nakamura K., Uchida T. Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoeschst staining and ultraviolet irradiation. *J. Reprod. Fertil.*, **82**, 173-178, 1988.

Tsunoda Y., Maruyama Y., Kila M. Nuclear transplantation of VIII to XVI cell embryos into enucleated oocytes in the rabbit. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **60**, 846-851, 1989.

Tsunoda Y., Tokunaga T., Imai H., Uchida T. Nuclear transplantation of male primordial germ cells in the mouse. *Development*, **107**, 407-411, 1990.

Turner R.P., Jaffe L.A., Fein A. Regulation of cortical vesicle exocytosis by inositol 1,4,5, triphosphate and GTP binding protein. *J. Cell. Biol.*, **102**, 70-76, 1986.

Van Soom A., Mijten P., Van Vlaederen I., Van den Branden J., Mahmoudzadeh A.R., de Kruif A. Birth of double-muscled belgian blue calves after transfer of in vitro produced embryos into dairy cattle. *Theriogenology*, **41**, 855-867, 1994.

Vitullo A., Ozil J.P. Repetitive calcium pulses drives meiotic resumption and pronuclear formation. *Devl. Biol.*, **151**, 128-136, 1992.

Wabl M.R., Brun R.B., Pasquier L. Lymphocytes of the toad *Xenopus Laevis* have the gene set for promoting tadpole development. *Science*, **190**, 1310, 1975.

Ware C.B., Barnes F.L., Maiki-Laurila M., First N.L. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Research*, 2 2, 265-275, 1989.

Wassarman P.M., Fujiwara K. Immunofluorescent anti-tubulin staining of spindles during meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. *J. Cell Sci.* 2 9, 171-188, 1978.

Westhusin M.E., Pryor J.H., Bondioli K.R. Nuclear transplantation in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 2 8, 119-123, 1991.

Westhusin M.E., Levanduski M.J., Scarborough R., Looney C.R., Bondioli K.R. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into H \ddot{a} chst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J. Reprod. Fertil.*, 9 5, 475-480, 1992.

Westhusin M.E., Arcellana-Panlilio M., Harvey M., Jones K., Schultz G.A. Gene expression in cloned bovine embryos. *In* IETS Satellite Symposium on "Application of molecular biology to reproduction" Ed. Schultz G.A. and Westhusin M.E., University of Calgary Health Sciences Center, Calgary, 1995.

Whittaker M.J., Steinhart R.A. Ionic regulation of egg activation. *Q. Rev. Biophys.*, 1 5, 593-666, 1982.

Whittaker M.J., Irvine R.F. Inositol 1,4,5, triphosphate microinjection activates sea-urchin eggs. *Nature*, 3 12, 636-639, 1984.

Willadsen S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos; *Nature*, 3 20, 63-65, 1986.

Willadsen S.M. Cloning sheep and cow embryos. *Genome*, 3 1, 956-962, 1989.

Willadsen S.M., Janzen R.E., McAlister R.J., Shea B., Hamilton G., McDermand D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 3 5, 161-170, 1991.

Xu K.P., Greve T., Smith S., Hyttel P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2 7, 505-519, 1986.

Yang X. Featured article: Embryo cloning by nuclear transfer in cattle and rabbit. *Embryo transfer newsletter*, 9 N $^{\circ}$ 4, 10-22, 1991.

Yang X., Anderson G.B. Micromanipulation of mammalian embryos: principles, progress and future possibilities. *Theriogenology*, 3 8, 315-335, 1992.

Yang Z., Smith L.C. Parthenogenetic development in vitro of bovine secondary oocytes exposed to a single electric pulse. *Theriogenology*, 3 9, 344, 1993.

Yong Z., Jianchen W., Jufen Q., Zhiming H. Nuclear transplantation in goats. *Theriogenology*, 3 5, 299, 1991.

Zoli A., Guilbault L.A., Delahaut P., Ortiz W.B., Beckers J-F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.*, 46, 83-92, 1992.

Zucker R.S., Steinhart R.A. Prevention of the cortical reaction in fertilized sea-urchin eggs by injection of calcium chelating ligand. *Biochim. Biophys. Acta*, 54, 559-466, 1978.

LISTE DES PUBLICATIONS



Articles en premier auteur:

Articles avec comité de lecture:

OBTENTION DE BLASTOCYSTES APRES MATURATION ET FECONDATION "IN VITRO" D'OVOCYTES DE BOVIN: PREMIERS RESULTATS.

Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Beckers J.F., Ectors F.
Ann.Méd.Vét., 132, 517-519, 1988.

MATURATION ET FECONDATION IN VITRO CHEZ LES BOVINS: NAISSANCE D'UN VEAU.

Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Delval A., Beckers J.F., Ectors F.
Ann.Méd.Vét., 133, 435-436, 1989.

COMPARISON BETWEEN CULTURE OF BOVINE EMBRYOS IN VITRO VERSUS DEVELOPMENT IN RABBIT OVIDUCTS AND IN VIVO.

Ectors F.J., Thonon F., Delval A., Fontes R.S., Touati K., Beckers J.F., Ectors F.
Livestock Production Science, 36, 29-34, 1993.

LE CLONAGE PAR TRANSFERT DE NOYAU DANS L'ESPECE BOVINE: PREMIERS RESULTATS.

Ectors F.J., Delval A., Touati K., Thonon F., Beckers J.F., Ectors F.
Ann. Méd. Vét., 137, 427-431, 1993.

LE CLONAGE PAR GREFFE DE BLASTOMERE: NAISSANCE DU PREMIER VEAU.

Ectors F.J., Delval A., Touati K., Thonon F., Beckers J.F., Ectors F.
Ann. Méd. Vét., 137, 573-574, 1993.

CYTOGENETIC STUDY OF BOVINE OOCYTES MATURED IN VITRO

Ectors F.J., Koulischer L., Jamar M., Herens C., Verloes A., Remy B., Beckers J-F.
Theriogenology, 44, 445-450, 1995.

DEVELOPMENT POTENTIAL OF RECONSTRUCTED BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN FIRST AND SECOND CYCLE OF NUCLEAR TRANSFER.

Ectors F.J., Delval A., Smith L.C., Touati K., Remy B., Beckers J.F., Ectors F.
Soumis à Theriogenology: accepté, sera publié en 1995.

LE DETERMINISME GENETIQUE DE LA DIFFERENCIATION SEXUELLE HUMAINE.

Ectors F.J.

Soumis à la Revue Médicale de Bruxelles

Articles sans comité de lecture:

LE CLONAGE PAR TRANSFERT DE NOYAU DANS L'ESPECE BOVINE: PREMIERS RESULTATS.

Ectors F.J., Delval A., Thonon F., Beckers J.F., Ectors F.
Bulletin de l'Académie Royale de Médecine, 148, 262-270, 1993.

Articles en collaboration:

SOME FACTORS AFFECTING SUCCESSFUL VITRIFICATION OF MOUSE BLASTOCYSTS.

Van Der Zwalm P., Gaurois B., Ectors F.J., Touati K., Massip A., Ectors F.
Theriogenology, 30, 1177-1190, 1988.

EFFET D'UNE PRESTIMULATION OVARIENNE EN DEBUT DE CYCLE SUR LA REPONSE AU TRAITEMENT DE SUPROVULATION CHEZ LA VACHE.

Touati K., Bormans M., Ectors F.J., Delval A., Beckers J.F., Ectors F.
Ann.Méd.Vét., 133, 609-612, 1989.

MISE AU POINT SUR LA FOLLICULOGENESE

Touati K., Beckers J-F., Ectors F.J., Ectors F.
Ann.Méd. Vét., 133, 583-588, 1989.

MULTIPLICATION DES EMBRYONS CHEZ LES BOVINS : POSSIBILITES ACTUELLES ET FUTURES.

Ectors F., Beckers J-F., Ectors F.J., Delval A.
Dans " Biotechnologies en sélection animales" IRSIA Octobre 1989.

LE SEXAGE D'EMBRYONS BOVINS PAR LA TECHNIQUE DE L'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR LA POLYMERASE (ACP) D'UNE SEQUENCE Y-SPECIFIQUE BOVINE.

Grobet L., Schwers A., Charlier C., Marcq F., Ectors F.J., Touati K., Hanset R.
Ann. Méd. Vét., 136, 119-124, 1992.

LE POINT SUR LA PRODUCTION D'EMBRYONS BOVINS IN VITRO: LIMITATIONS ET PERSPECTIVES DE LA RECHERCHE.

Thonon F., Ectors F.J., Delval A., Lens H., Touati K., Beckers J-F., Ectors F.
Ann. Méd. Vét., 138, 33-40, 1994.

DEVELOPMENT OF A COMBINED NEW MECHANICAL AND ENZYMATIC METHOD FOR THE ISOLATION OF INTACT PREANTRAL FOLLICLES FROM FETAL, CALF AND ADULT BOVINE OVARIES.

Figueiredo J.R., Hulshof S.C.J, Van den Hurk R., Ectors F.J., Fontès R.S., Nusgens B., Bevers M.M., Beckers J-F.
Theriogenology, 40, 789-799, 1993.

PRESERVATION OF OOCYTE AND GRANULOSA CELL MORPHOLOGY IN BOVINE PREANTRAL FOLLICLES CULTURED IN VITRO.

Figueiredo J.R., Hulshof S.C.J, Van den Hurk R., Nusgens B., Bevers M.M., Ectors F.J., Beckers J-F.
Theriogenology, 41, 1333-1346, 1994.

**FRACTIONATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF PROTEINS
EXTRACTED FROM THE BOVINE FALLOPIAN TUBE: PREPARATION OF
REAGENTS FOR FURTHER PURIFICATIONS.**

Remy B., Rabahi F., Duwez L., Thonon F., Ectors F.J., Ectors F., Beckers J-F.
Theriogenology, 44, 95-107, 1995.

**NUCLEAR TRANSPLANTATION USING BOVINE GONIAL CELLS FROM MALE
FŒTUSES.**

Delhaise F., Ectors F.J., De Roover R., Ectors F., Dessy F.
Soumis à Veterinary Records.

Abstracts en premiers auteur:

OOCYTE VITRIFICATION IN MICE.

Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Psalti I., Loumaye E., Thomas K.
Vth Meeting Contact Group In Vitro Fertilization - December 1987.

RESEARCH WORK FOR AN OPTIMIZATION OF AN IN VITRO MATURATION AND FERTILIZATION METHOD OF THE BOVINE OOCYTES.

Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Beckers J.F., Ectors F
3th Franco-Czechoslovak Meeting, December 13-14 1988, INRA Jouy-en-Josas, France

IN VITRO MATURATION AND FERTILIZATION OF BOVINE OOCYTES.

Ectors F.J., Delval A., Bormans M., Touati K., Beckers J.F., Ectors F.
Vth Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology.
June 25-28th 1989, Malmö, Sweden. Accepted for oral presentation.

IN VITRO MATURATION AND FERTILIZATION OF BOVINE OOCYTES.

Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Beckers J.F., Ectors F.
Theriogenology, 31, 188, 1989.

EFFECT OF NON-PROTEIC MEDIUM DURING IN VITRO MATURATION ON IN VITRO DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYOS.

Ectors F.J., Fontes R.S., Thonon F., Delval A., Figueirido J.R., Beckers J.F., Ectors F.
Theriogenology, 37, 206, 1992.

COMPARISON BETWEEN IN VITRO CULTURE OF BOVINE EMBRYOS IN CONDITIONED MEDIUM AND IN PRESENCE OF BOVINE OVIDUCTAL CELLS VERSUS DEVELOPMENT IN VIVO AND IN RABBIT OVIDUCT.

Ectors F.J., Thonon F., Delval A., Fontes R.S., Touati K., Beckers J.F.
Theriogenology, 39, 211, 1993.

BOVINE EMBRYO DEVELOPMENT AND CHROMOSOME ANOMALIES: TECHNICAL APPROACH.

Ectors F.J., Fontes R.S., Koulischer L.
Abstract of the International Symposium on Preimplantation Genetics and Assisted Fertilization. 7, 21/22 February 1992.

FIRST AND SECOND CYCLE NUCLEAR TRANSFER IN CATTLE: COMPARISON OF EFFICIENCY IN EMBRYO DEVELOPMENT AND ONGOING PREGNANCIES.

Ectors F.J., Delval A., Smith L.C., Touati K., Beckers J.F., Ectors F.
Theriogenology, 43, 204, 1995.

Abstracts en collaborations:

VITRIFICATION OF BOVINE BLASTOCYSTS

Van Der Zwalmen P., Touati K., Ectors F.J., Massip A., Beckers J-F., Ectors F.
Theriogenology, 3 1, 270, 1989.

LOW DOSES OF FSH IN EARLY ESTROUS CYCLE STIMULATE FOLLICULAR GROWTH MATURATION AS CONFIRMED BY SUBSEQUENT SUPEROVULATORY RESPONSE.

Touati K., Van Der Zwalmen P., Ectors F.J., Beckers J.F., Ectors F.
Vth Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology.
June 25-28th 1989, Malmö, Sweden.

VARIABLE COMPOSITION OF BOVINE FETAL CALF SERUM : A PROSPECTIVE STUDY FOR IN VITRO OOCYTES AND EMBRYOS CULTURE.

Beckers J-F., Ballman-Wouters P., Ectors F.J., Touati K., Bormans M., Delval A. and Ectors F.
5e Colloque Scientifique de l'AETE, 130, Lyon 8 et 9 septembre 1989.

CONGELATION DE DEMI-EMBRYONS PAR LA METHODE GLYCEROL-SUCROSE.

Touati K., Bormans M., Ectors F.J., Ectors F.
5e colloque scientifique de l'AETE, 182, Lyon 8 et 9 septembre 1989.

RELATION INVERSE ENTRE LA CONCENTRATION DES SERUMS FOETAUX BOVINS EN HORMONE CHORIONIQUE SOMATOMAMMOTROPE ET LEUR AGE.

Beckers J-F., Ballman-Wouters P., Ectors F.J., Touati K., Delval A., Bormans M. and Ectors F.
Reproduction Nutrition Developpement, 2 9(2 Suppl.), p.29, 1989.

DEMONSTRATION OF SOMATOGENIC RECEPTORS IN THE BOVINE CORPUS LUTEUM. CONJECTURAL EFFECT OF TROPHIC HORMONE ON SUPEROVULATORY RESPONSE.

Beckers J.F., Wouters-Ballman P., Viviers-Donnay I., Ectors F.J., Touati K., Ectors F.
The endocrine Society. 71e Annual Meeting, June 21-24, 1989, Seattle, Washington.

LOW DOSES OF FSH STIMULATE FOLLICULAR GROWTH AND MATURATION IN ANESTROUS HEIFERS.

Beckers J-F., Ballman-Wouters P., Viviers-Donnay I., Touati K., Doem G., Lhoest B., Lambert E., Laurent Y., Ectors F.J., Ectors F.
Theriogenology, 3 1, 172, 1989.

LOW DOSE OF FSH EARLY IN ESTROUS CYCLE ENHANCES SUPEROVULATORY RESPONSE IN HEIFERS.

Touati K., Van Der Zwalmen P., Ectors F.J., Beckers J-F., Ectors F.
Theriogenology, 3 1, 269, 1989.

RABBIT AND BOVINE OVIDUCTAL EPITHELIAL CELL CULTURE MEDIA ARE ABLE TO SUPPORT EARLY DEVELOPMENT FROM ZYGOTE TO THE BLASTOCYST STAGE.

Fontes R.S., Ectors F.J., Delval A., Touati K., Beckers J-F., Ectors F.
Theriogenology, 35, 201, 1991.

MECHANICAL AND ENZYMATIC METHOD FOR THE ISOLATION OF INTACT PREANTRAL FOLLICLES FROM FETAL, CALF AND ADULT BOVINE OVARIES.

Figueiredo J.R., Hulshof S.C.J., Ectors F.J., Fontes R.S., Nussgens B., le Point A., Beckers J-F.

8e Colloque Scientifique de l'AETE, 152, Lyon, 11-12 septembre 1992.

EFFECT OF FETUIN ON IN VITRO MATURATION OF BOVINE OOCYTES IN DEFINED MEDIA.

Fontes R.S., Figueirdo J.R., Ectors F.J., Beckers J-F., Ectors F.

8e Colloque Scientifique de l'AETE, 156, Lyon, 11-12 septembre 1992.

EFFECT OF PROTEIN SUPPLEMENTS ON IN VITRO CO-CULTURE TO BLASTOCYSTS AND HATCHING STAGE OF BOVINE OOCYTES.

Fontes R.S., Ectors F.J., Thonon F., Figueirdo J.R., Beckers J-F., Ectors F.

Theriogenology, 37, 214, 1992.

IN VITRO MATURATION, FERTILIZATION AND DEVELOPMENT RATES OF BOVINE OOCYTES CONNECTED WITH THE REPRODUCTIVE STATUS OF THE DONOR.

Thonon F., Ectors F.J., Delval A., Fontes R.S., Touati K., Beckers J-F.

Theriogenology, 39, 330, 1993.

MEIOTIC CHROMOSOMES OF BOVINE OOCYTES MATURED IN VITRO

Koulischer L., Ectors F.J., Fontes R.S., Jammam M.

11th International Chromosome Conference, Edinburgh, 66, 1992.

CHROMOSOME STUDIES OF BOVINE OOCYTES MATURED IN VITRO

Koulischer L., Ectors F.J., Jammam M., Herens C., Beckers JF.

VIII World Congress on In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, Kyoto, OC-207, 15 may 1993. Accepted for oral presentation.

PRESERVATION OF OOCYTE AND GRANULOSA CELL MORPHOLOGY IN BOVINE PREANTRAL FOLLICLES CULTURED IN VITRO: 1-MORPHOLOGICAL ASPECTS.

Figueirdo J.R., Hulshof S.C.J., Nussgens B., Van Der Hurk R., Ectors F.J., Ectors F., Fontes R.S., Beckers J-F.

9e Colloque Scientifique de l'AETE, 196, Lyon 10-11 septembre 1993.

MINIMAL CONDITIONS FOR VIABILITY PRESERVATION OF BOVINE PREANTRAL FOLLICLES CULTURED IN VITRO: EFFECTS OF PYRUVATE, GLUTAMINE AND HYPOXANTINE.

Figueirido J.R., Hulshof S.C.J., Nusgens B., Van Der Hurk R., Ectors F.J., Ectors F., Fontes R.S., Beckers J-F.

9e Colloque Scientifique de l'AETE, 198, Lyon 10-11 septembre 1993.

RUMINANT EMBRYO EXCHANGES USING CRYOPRESERVATION: CURRENT AND FUTURE POSSIBILITIES.

Touati K., Ectors F.J., Thonon F., Figueirido J.R., Fontes R.S., Delval A., Ectors F., Beckers J-F.

20th BCLAS Symposium - mercredi 28 avril 1993 à Bruxelles.

A STEP-WISE PROCEDURE FOR CRYOPROTECTANT EQUILIBRATION IMPROVES THE SURVIVAL RATE AFTER THAWING OF IN VITRO PRODUCED EMBRYOS.

Thonon F., Lens H., Touati K., Ectors F.J., Delval A., Beckers J-F, Ectors F.

Theriogenology, 43, 338, 1995.

SOURCES OF BOVINE OVARIES AFFECT SIGNIFICANTLY THE DEVELOPMENT OF ISOLATED PREANTRAL FOLLICLE IN VITRO.

Figueiredo J.R., Hulshof S.C.J., Thiry M., Nusgens B., Van den Hurk R., Ectors F.J., Bevers M.M., Beckers J-F.

10e Colloque Scientifique de l'AETE, 172, Lyon 9-10 septembre 1994.

EFFECTS OF EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS ON THE ATTACHMENT OF BOVINE PREANTRAL FOLLICLES IN SERUM FREE MEDIUM.

Figueiredo J.R., Hulshof S.C.J., Thiry M., Nusgens B., Van den Hurk R., Ectors F.J., Bevers M.M., Beckers J-F.

10e Colloque Scientifique de l'AETE, 174, Lyon 9-10 septembre 1994.

SURVIVAL AND PREGNANCY RATES, AFTER VITRIFICATION, OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO.

Delval A., Ectors F.J., Touati K., Remy S., Beckers J-F., Ectors F.

11e Colloque Scientifique de l'AETE; accepté pour présentation orale, Hannover 8-9 Septembre 1995.



ARTICLES



Article 1:

COMPARISON BETWEEN CULTURE OF BOVINE EMBRYOS IN VITRO VERSUS DEVELOPMENT IN RABBIT OVIDUCTS AND IN VIVO.

Ectors F.J., Thonon F., Delval A., Fontes R.S., Touati K., Beckers J.F., Ectors F.
Livestock Production Science, 36, 29-34, 1993.

Article 2:

LE CLONAGE PAR TRANSFERT DE NOYAU DANS L'ESPECE BOVINE: PREMIERS RESULTATS.

Ectors F.J., Delval A., Touati K., Thonon F., Beckers J.F., Ectors F.
Ann. Méd. Vét., 137, 427-431, 1993.

Article 3:

CYTOGENETIC STUDY OF BOVINE OOCYTES MATURED IN VITRO

Ectors F.J., Koulischer L., Jamar M., Herens C., Verloes A., Remy B., Beckers J-F.
Soumis à Theriogenology: accepté, sera publié en 1995.

Article 4:

DEVELOPMENT POTENTIAL OF RECONSTRUCTED BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN FIRST AND SECOND CYCLE OF NUCLEAR TRANSFER.

Ectors F.J., Delval A., Smith L.C., Touati K., Remy B., Beckers J.F., Ectors F.
Soumis à Theriogenology: accepté, sera publié en 1995.



Comparison between culture of bovine embryos *in vitro* versus development in rabbit oviducts and *in vivo*

F.J. Ectors, F. Thonon, A. Delval, R.S. Fontes, K. Touati, J-F. Beckers
and F. Ectors

*Dept. of Animal Endocrinology and Reproduction (IRSIA Research Unit), Faculty of Veterinary
Medicine of the State University of Liège, Belgium*

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the efficiency of different embryo culture methods for *in vitro* embryo production: development in co-culture with bovine oviductal epithelial cells (BOEC), in BOEC conditioned medium (CM) or in rabbit oviducts, versus *in vivo* produced embryos. There was no significant difference in terms of percentages of cleaved and 8-cell stages obtained between CM and BOEC. In CM, 24.8% of the cleaved embryos became blastocysts. In BOEC, 14.5% of the cleaved embryos became blastocysts. Among the 190 zygotes transferred in the rabbit oviducts, 127 have been recovered 5 days later, and 17.4% became blastocysts. There was no significant difference in term of blastocyst formation between the development in rabbit and in BOEC. However, there was a significant difference between the CM group and the two other groups. The numbers of cells in blastocysts from different sources were investigated: *in vivo* blastocysts contained 107 cells assumed to be 100%, *in vitro* blastocysts developed in rabbit oviduct 100.1 cells (93.3%), BOEC blastocysts 90.8 cells (84.6%) and CM blastocysts 72.3 cells (67.3%). This study confirmed earlier works on the oviduct effect on blastocyst quality in terms of development rate and cell number.

Key words: Bovine embryo; Rabbit oviduct; Embryo culture

INTRODUCTION

Efficient *in vitro* techniques as a low cost source of embryos are of considerable value for the development of new biotechnology of agricultural interest. Using *in vitro* methods for oocyte maturation and fertilization, it is now possible to produce zygotes and embryos at a stage compatible with transfer. It is generally accepted that the *in vivo* conditions offer a better environment for proper embryo development than its *in vitro* counterpart, and that a more physiological development renders the embryo more reliable to undergo nor-

Correspondence to: F.J. Ectors, Dept. of Animal Endocrinology and Reproduction (IRSIA Research Unit), B 41 Faculty of Veterinary Medicine of the State University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

mal implantation and to evolve into normal pregnancy (Xu et al., 1992). In order to improve the *in vitro* development procedures, several techniques have been developed to test the influence of treatments on viability of cattle embryos. IVF zygotes and cleavage-stage embryos have been evaluated after culture *in vitro* (Tervit et al., 1972; Camous et al., 1984; Heyman et al., 1987) or after transfer into the oviducts of sheep or rabbit females (Lawson et al., 1972; Boland, 1984; Sirard et al., 1985; Sirard and Lambert, 1985; Lu et al., 1987; Hawk et al., 1989).

The aim of this work was to evaluate the efficiency of three different embryo culture methods for the *in vitro* maturation-fertilization (IVM-IVF) embryo production. The IVM-IVF zygotes were developed either (1) in co-culture in presence of bovine oviductal epithelial cells (BOEC), or (2) in BOEC conditioned medium (CM) versus (3) *in vivo* in the oviducts of pseudo-pregnant rabbit females. We compared firstly the rates of development on days 3 and 8, in the different methods. In a second time, in order to compare the quality of development of the embryos, a part of them from each treatment was fixed and stained to count their nuclei number.

MATERIALS AND METHODS

The ovaries were collected at a local abattoir within 30 minutes after slaughter of the animal and conserved in saline at $\approx 30^{\circ}\text{C}$. One hour later (transit time to the laboratory), all the follicles from 1 to 8 mm diameter were punctured and the oocyte-cumulus complexes were washed three times in TCM 199 hepes (Gibco: 041-02350) supplemented with BSA fraction V (3 mg/ml, Sigma: A-9647). Only oocytes with an intact, unexpanded cumulus and evenly granulated ooplasm were then cultured for 24-25 hours in 1 ml of TCM 199 (Sigma: M-4530), at 39°C in an atmosphere of 5% CO_2 in air. Fourthly oocytes were cultured per ml. Maturation medium was supplemented with 20% heat-treated cow serum (D20), 0.27 mM pyruvate, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LH (LH: 1,0 \times NIH-LH-S1), 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH (FSH: 75 \times NIH-FSH-S1) and antibiotics (penicilin: 100 U/ml; streptomycin: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). All fertilizations were done with the same belgian bull. Sperm selection was performed with a percoll-gradient (final sperm concentration was $10^6/\text{ml}$) and the gametes were co-incubated for 18 hours in IVF-TALP (Parrish et al., 1988) with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin. After fertilization, the oocytes were stripped out of cumulus cells by repeated pipetting through a small-bore pipette, and assigned randomly to culture in rabbit, in BOEC or in CM. The bovine oviducts were recovered at a local slaughterhouse from normally cycled heifers. They were carried to the laboratory in saline at 0°C within 1 hour. After dissection, the fallopian tubes were sterilised by plunging in ethanol for a few seconds before being washing three times in saline. After longitudinal section of the tube, the scratching of the oviductal mucosae was performed by a surgical

blade. After washing the cells five times in PBS, they were cultured for 24 hours in TCM 199 supplemented with 20% FCS and antibiotics (50mg/ml gentamycin). Before using them for embryo culture, they were washed five times again in PBS to remove the dead cells. The methods to obtain BOEC and CM were described by Eyestone and First (1989). The zygotes were cultured in 1 ml of TCM 199 with BOEC or in 50 μ l droplets under oil (light mineral oil, Sigma: M-3516) of conditioned medium. The transfers in rabbit oviduct were performed 48 h after synchronization of estrous by 50 i.u. hCG i.v.. The embryos were introduced into the fallopian tube via the ostium abdominale with a Wallace embryo replacement catheter. After five days, the embryos were recovered by flushing the oviducts and were cultured for 3 days in TCM 199+10% FCS. On day 8 post-insemination, part of the blastocysts were fixed to determine cell number based on the nuclear counts after staining with H \ddot{a} chst 33342 (Pursel et al., 1985). The in vivo embryos were produced by flushing on day 8 after insemination of superovulated cows.

RESULTS

There was no significant difference between conditioned medium and co-culture in percentages of cleavage and 8-cell embryos obtained. In conditioned medium, 24.8% of the cleaved embryos developed into blastocysts or 18.5% (66/357) of the oocytes developed into blastocysts. In BOEC, 14.5% of the cleaved embryos developed into blastocysts or 10.3% (62/604) of the oocytes developed into blastocysts. Among the 190 zygotes transferred in the rabbit oviducts, 66.8% (127) of them were recovered 5 days later, and 17.4% (33/190) developed into blastocysts. There was no significant difference between the development in rabbit and the culture in CM in the percentages of

TABLE 1

Percentages of cleavage, 8-cell stages and blastocysts obtained in vitro or in rabbit oviduct: Values with different superscripts are significantly different (Chi-Square: $P < 0.05$).

Types of culture	Nr of oocytes (%)	Oocytes cleaved (%)	8-cell embryos (%)	Blastocysts (%)
Rabbit*	190	ND	ND	33 ^d (17.4)
CM	357	266 ^a (74.5)	152 ^b (42.6)	66 ^d (18.5)
BOEC	604	428 ^a (71.0)	185 ^c (30.6)	62 ^e (10.3)

*66.8% (127/190) of the transferred zygotes were recovered 5 days later.

TABLE 2

Comparison between the mean numbers of nuclei according to the treatment: A: In vivo maturation, in vivo fertilization and in vivo development ($n=6$). B: In vitro maturation, in vitro fertilization and in vivo development into the rabbit oviduct ($n=13$). C: In vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro co-culture with BOEC ($n=24$). D: In vitro maturation, in vitro fertilization and in vitro culture in CM ($n=24$).

Treatment	Mean \pm SD	Range	Relative cell numbers (%)
A	107.33 \pm 28.22	70-145	100.0
B	100.15 \pm 31.50	66-165	93.3
C	90.83 \pm 31.34	43-158	84.6
D	72.29 \pm 27.98*	41-160	67.3

*Significant by t-test ($P < 0.05$).

blastocysts. However, there was a significant difference between the BOEC group and the two others groups.

Table 2 shows the number of cells in blastocysts from different treatments.

DISCUSSION

In order to investigate the ability of in vitro embryos to evolve in ongoing pregnancies, this study describes the effects of in vitro steps (maturation, fertilization and development) on the blastocyst rates at day 8, and on the relative cell number in such blastocysts.

In this study, in terms of blastocyst rates (see Table 1), BOEC gave the lowest results. But because the CM group was no significantly different from the rabbit group (in vivo and in vitro development groups), we considered that the difference was not sufficient to exclude one of the different treatments. The lower rate obtained in the co-culture group may be the result of a more important variability between the culture conditions. These results seem to indicate that the conditions of culture do not influence the rates of development. So, for the in vivo and in vitro developed embryos, in vitro maturation and fertilization do not affect greatly the oocytes. Maybe only a single class of oocytes, representing 15 to 25% of the population, is able to produce blastocysts (Arlotto, 1992).

In contradiction of the results presented on the Table 1, Table 2 shows a significant difference between the CM group and all the others. Temporary transfer in rabbit oviduct permitted 93.5% of the normal in vivo number (group A). BOEC or CM give lower numbers of cells showing a non optimal condition environment (cytokins, cells interactions, ...).

Gandolfi and Moor (1987) and Gandolfi et al (1989) have developed experiments showing the importance of cell contacts between the embryo and the epithelium of the oviduct. Oviduct effect may involve different mecha-

nisms: Gandolfi et al. (1989) described in the sheep species a specific protein with a Mr 92000 having the ability to overcome the 8–16 cell block. Oviduct also secretes growth factors like peptide that can be responsible for cell multiplication (Voelkel and Hu, 1992). Moreover cell to cell interactions between blastomers and epithelial oviduct cells and between epithelial cells and stroma cells is probably very important. Maybe the cells do not only synthesize important factors for the embryo development but also their metabolism is important to facilitate the embryo development. They can produce, transform or eliminate some important or toxic metabolites. Even more, because of the possible exchanges between the epithelial cells and the embryo, the cells can develop throughout the culture. Nevertheless, the lower percentage of development in coculture could be explained by the differences in quality from one oviduct to the other. It is obvious that embryo production is greatly facilitated by the culture in conditioned medium or in BOEC; the new technologies (e.g. gene injection or embryo cloning) need a restauration of the quality of the embryo before a new cycle of micromanipulation or transfer and their efficiency could be increased by temporary *in vivo* development steps.

In conclusion, this study confirms earlier works (Gandolfi and Moor (1987) and Gandolfi et al. (1989)) on the favourable effect of the oviduct environment for the embryo development. Further researches are necessary to allow a quantitative evaluation of the effects of the different steps of *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture on development of zygotes to the blastocyst stage. This study is the first to show clearly the positive effect of the oviduct environment on the cell number in blastocysts.

REFERENCES

- Arlotto T., Leibfried-Rutledge M.L. and First N.L., 1992. Correlation of oocyte diameter with time of maturation in bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 46 Suppl. 1, 66.
- Boland M.P., 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21, 126–137.
- Camous S., Heyman Y., Meziou W. and Menezo Y., 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.* 72, 479–485.
- Eyestone W.H. and First N.L., 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 85, 715–720.
- Gandolfi F., Tiziana A. L. Brevini and Moor R.M., 1989. Effect of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl 38, 107–115.
- Gandolfi F. and Moor R.M., 1987. Stimulation of early development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 81, 23–28.
- Hawk H.W., Wall R.J. and Conley H.H., 1989. Survival of DNA-injected cow embryos temporarily cultured in rabbit oviduct. *Theriogenology* 32, 243–253.
- Heyman Y., Menezo Y., Chesne P. Camous S. and Garnier V., 1987. *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27, 59–68.

- Lawson R.A.S., Rowson L.E.A. and Adams C.E., 1972. The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J. Reprod. Fertil.* 28, 313-315.
- Lu K.H., Gordon I., Gallagher M. and McGovern H., 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 259-260, September 12.
- Parrish J.J., Susko-Parrish J. Winer M.A. and First N.L., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171-1180.
- Pursel V.G., Wall R.J., Rexroad C.E., Hammer R.E. and Brinster R.L., 1985. A rapid whole-mount staining products for nuclei of mammalian eggs. *Theriogenology* 24, 687-691.
- Sirard M.A., Lambert R.D., Menard D.P. and Bedoya M., 1985. Pregnancies after in-vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to cow uterus. *J. Reprod. Fertil.* 75, 551-556.
- Tervit H.R., Whittingham D.G. and Rowson L.E.A., 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30, 493-497.
- Voelkel S.A. and Hu Y.X., 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 37, 1117-1131.
- Xu K.P., Yadav B.R., Rorie R.W., Plante L., Betteridge K.J. and King W.A., 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 94, 33-43.

Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine: premiers résultats.

F.J. ECTORS, A. DELVAL, K. TOUATI, F. THONON, J.F. BÉCKERS et F. ECTORS

Centre de Recherches IRSIA-CERAD 2
Services d'Obstétrique et de Physiologie de la Reproduction
B41 Bât. de Radiologie + 1
4000 Sart-Tilman

Introduction

Le clonage ou l'obtention d'un grand nombre d'individus génétiquement identiques est une pratique courante en production végétale. Dans le domaine animal sur base de la formation naturelle de vrais jumeaux par clivage de l'embryon aux stades précoces (Massip et al., 1983), les premiers essais de multiplication ont eu recours à la section de l'embryon ou du bouton embryonnaire en plusieurs parties. Cette approche est cependant limitée car l'on n'a jamais pu produire plus de 4 individus par embryon. C'est pourquoi depuis quelques années, de nombreuses recherches ont été entreprises chez les mammifères domestiques en vue de la mise au point du clonage par transfert de noyau.

Cette technique nécessite la séparation des blastomères constituant l'embryon donneur et leur greffe dans le cytoplasme d'ovocytes énucléés, encore appelés cytoplastes. A l'heure actuelle, la greffe de noyau est devenue réalité. Elle a été réalisée pour la 1^{ère} fois chez les batraciens par Briggs et King (1952) qui ont réussi à implanter des noyaux de cellules embryonnaires de gre-

nouille dans des œufs dont le noyau avait été enlevé. Ces auteurs ont observé la naissance de têtards normalement constitués, mais le pourcentage de réussite devenait de plus en plus faible au fur et à mesure qu'ils utilisaient des cellules embryonnaires plus âgées. Tout se passait comme si ces dernières étaient déjà trop différenciées pour permettre l'expression des gènes nécessaires au développement de l'embryon.

Chez les mammifères, l'opération est plus compliquée car la période de totipotence du noyau embryonnaire est plus courte que chez les amphibiens. Elle a été réalisée pour la 1^{ère} fois : chez la souris par Mac Grath et Solter en 1983, chez les ovins par Willadsen en 1986 et chez les bovins par Prather et al. en 1987.

Actuellement, dans l'espèce bovine, la technique en est encore au stade expérimental, et si quelques succès sont enregistrés de par le monde (Tableau 1) le rendement global de l'opération est encore faible et ne dépasse pas 5 % à 10 % (Willadsen et al., 1991). Cependant, vu les avantages qu'une telle technique peut apporter à la sélection et à la multi-

RESUME

Le clonage par transfert de noyau fut réalisé pour la 1^{ère} fois chez les bovins par Prather et collaborateurs en 1987. Vu l'importance économique de ce mode de multiplication, de nombreuses équipes de recherche affinent la technique et étudient sa mise en application sur le terrain. Alors que l'énucléation de l'ovocyte receveur, l'injection et la fusion du blastomère donneur se réalisent avec succès; la maturation ovocytaire, la culture et la congélation de l'embryon reconstitué posent encore de nombreux problèmes. De plus, l'embryon reconstitué est plus fragile et l'on constate une augmentation sensible de la mortalité embryonnaire après transfert chez la receveuse. Néanmoins, 10 % des embryons reconstitués par transfert de blastomère et cultivés *in vitro* se développent jusqu'au stade blastocyste et ont donné lieu à des gestations.

TABLEAU 1
Développement des embryons bovins après transfert de noyaux.

Embryons donneurs	Développement in vitro		Naissances	Références
	morula/ blastocyste	%		
4-16 c.	23/185	12,0	2	Prather et al. (1987)
16 c.	92/493	18,6	/	Westhusin et al. (1991)
32-40 c.	84/375	22,0	/	Westhusin et al. (1991)
16-64 c.	280/1181	23,7	92	Bondioli (1991)
16-32 c.	10/102	9,8	/	Clement-Sengewald et al. (1992)
8-64 c.	/	/	101	Willadsen et al. (1991)
32 c.	19/96	19,8	/	Heyman et al. (1992)
32 c.	14/86	16,3	/	Heyman et al. (1992)

D'après Renard et Heyman (1992).

plication des animaux d'élite, nous avons entrepris d'importantes recherches dans ce domaine ¹.

Matériels et méthodes

Les embryons donneurs

Les embryons donneurs ont soit été obtenus *in vitro* suivant le protocole décrit précédemment (Ectors et al, 1993), soit récoltés *in vivo* après superovulation des génisses ou vaches donneuses au moyen de 32 U Armour de pFSH additionnée de 40 % de pLH. Les embryons ont été récoltés soit par méthode non chirurgicale au jour 5 à 6 après l'insémination, soit par abattage et rinçage des oviductes et de l'utérus. Les embryons donneurs ont été utilisés immédiatement ou ont été congelés en vue de leur utilisation ultérieure suivant la technique de congélation décrite par Touati et Ectors (1991) pour le transfert direct.

Pour séparer les blastomères, l'embryon est maintenu par sa zone pellucide à l'aide d'une pipette, tandis qu'une aiguille dilacère la zone pellucide jusqu'à obtenir la sortie de l'amas cellulaire. Celui-ci est ensuite disloqué par aspirations successives dans la pipette de maintien de manière à isoler les différents blastomères qui le constituent. Cette opération est facilitée par l'emploi de PBS (phosphate buffered saline) dépourvu de CaCl₂ et de MgSO₄.

Les ovocytes receveurs

Les ovocytes immatures sont obtenus par ponction d'ovaires récoltés aux abat-

¹ Ces recherches ont été réalisées sous les auspices de l'IRISA.

toirs. Seuls les follicules de 1 à 8 mm de diamètre sont ponctionnés, et les ovocytes entourés d'un cumulus oophorus dense et homogène, sont placés en maturation dans un milieu TCM 199 bicarbonaté additionné de 20 % de sérum de vache en proœstrus, de 0,27 mM de pyruvate de sodium, de 0,5 µg/ml de pFSH, de 5 µg/ml de pLH, de 100 UI/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine. Après 24 heures, les complexes ovocytes-cumulus sont exposés pendant 4 minutes à l'action d'une solution d'hyaluronidase (Sigma: H-3506), à la concentration de 1 mg/ml, afin de dissocier le cumulus oophorus. Les dernières cellules de la corona sont éliminées par aspirations successives au travers d'une pipette calibrée.

Techniques de micromanipulation

a) Enucléation de l'ovocyte (Figure 1)

Une fois dénudés, les ovocytes sont sélectionnés en fonction de la présence du premier globule polaire. Ils sont ensuite exposés à un agent déstabilisateur du cytosquelette (cytochalasine B, Sigma: C-6762; 7,5 µg/ml), et énucléés par aspiration de leur globule polaire ainsi que du 1/4 de cytoplasme sous-jacent. Cette opération se déroule au moyen d'une pipette de maintien (diamètre extérieur de 110 µm et diamètre intérieur 25 µm) et d'une pipette d'aspiration plus fine (diamètre extérieur 30 µm, diamètre intérieur 20 µm) reliée à un microinjecteur de type Narishigé IM 5b. L'absence de noyau est contrôlée par incubation momentanée (10 minutes) des ovocytes avec un colorant (Hoechst 33342; Sigma B-2261; 5 µg/ml) et exposition temporaire (< 10 secondes) à la lumière UV. Les ovocytes énucléés, ou cytoplastes, sont remis en culture dans leur milieu de maturation pour une durée de 15 à 17 h.

b) Transfert de blastomère (Figure 2)

Les blastomères isolés sont introduits dans l'espace périvitellin des ovocytes énucléés au moyen d'une pipette d'injection reliée au microinjecteur. Immédiatement après la micromanipulation, les couples cytoplaste-blastomère sont soumis à un champ électrique (une impulsion de 2,7 Kvolt/cm pendant 50 mi-

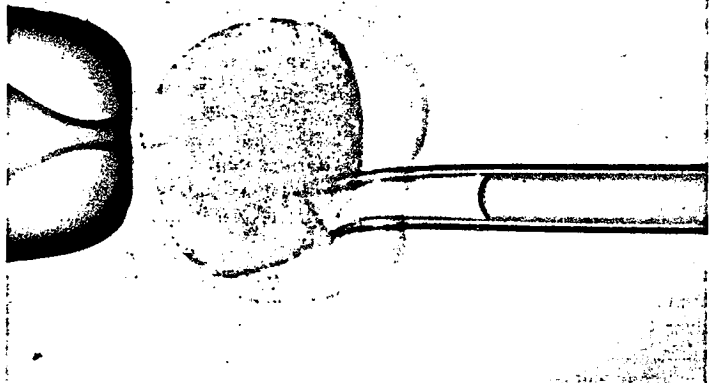


Figure 1

Enucléation de l'ovocyte (≅ 150 µm): vu la forte concentration en lipides du cytoplasme, le noyau de l'ovocyte n'est pas visible et l'enucléation est réalisée en aveugle par aspiration du globule polaire (G.P.) ainsi que du 1/3 de cytoplasme sous-jacent. Le noyau en métaphase est normalement situé à proximité du G.P. (grossissement : × 200).

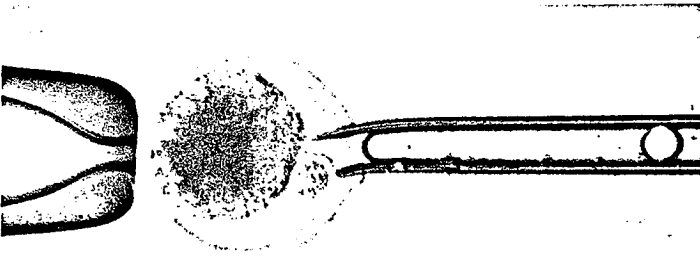


Figure 2
Transfert d'un blastomère dans l'espace périvitellin d'un ovocyte énucléé.
(Grossissement : $\times 200$).

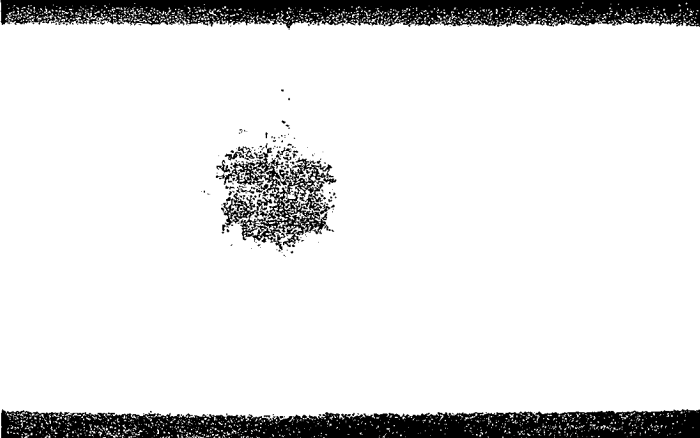


Figure 3
L'incorporation du noyau du blastomère dans le cytoplasme de l'ovocyte receveur nécessite la fusion de leurs membranes. Celle-ci est induite en soumettant le couple cytoplaste-blastomère à un champ électrique (une impulsion de 2,7 Kvols/cm durant 50 microsecondes). Pour ce faire, l'embryon à reconstituer est placé entre deux électrodes parallèles distantes de 240 μm (traits noirs de la photo), de manière à ce que les membranes à fusionner soient disposées perpendiculairement au champ électrique. (Grossissement : $\times 200$).

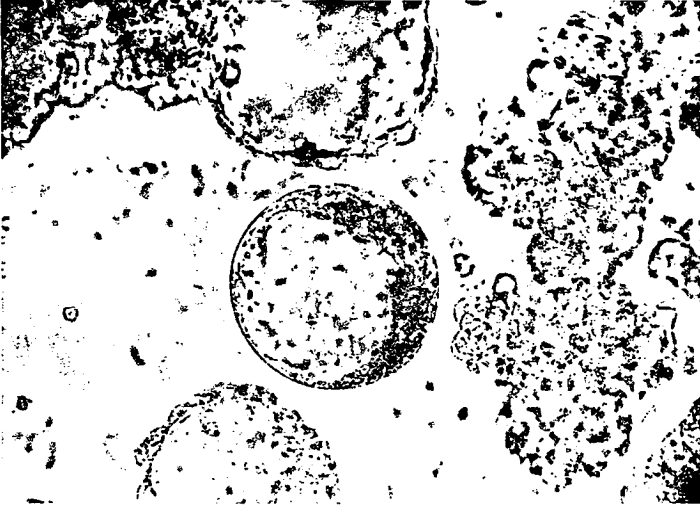


Figure 4
Blastocyste obtenu par clonage après sept jours de co-culture *in vitro* en présence de cellules épithéliales tubaires bovines (grossissement : $\times 200$). Les embryons bovins sont incapables de se développer *in vitro* au-delà du stade VIII cellules s'ils ne trouvent pas dans le milieu des facteurs protéiques sécrétés par les cellules de l'oviducte.

crosecondes), afin de provoquer la fusion de deux cellules et l'activation du cytoplaste (Figure 3). La chambre d'électrofusion est constituée de deux fils de platine de 100 μm de diamètre espacés de 240 μm . Elle est remplie d'un milieu non conducteur répondant à la composition suivante : mannitol (Sigma: M-1902; 0,28 M), CaCl_2 (0,01 mM) et MgSO_4 (0,1 mM). Ces ions sont nécessaires à l'activation de l'ovocyte. Tous les autres sels ont été éliminés du milieu d'électrofusion car leur présence entraîne l'apparition d'un courant plus intense qui se révèle létal pour les cellules.

Développement des embryons reconstitués (Figure 4)

Les embryons reconstitués sont développés *in vitro* en présence de cellules épithéliales flottantes provenant d'oviductes bovins (co-culture). La co-culture est réalisée en gouttes de 50 μl de Ménézo B2, recouvertes d'huile minérale (Sigma: M-3516). Les embryons sont cultivés à 39°C dans une atmosphère de 5 % de CO_2 , saturée en eau. La culture est examinée après 3, et 7 jours en vue d'évaluer les pourcentages de clivage, de stade VIII et le taux de blastocystes.

Les embryons ainsi obtenus peuvent, soit servir de donneurs pour un second cycle de micromanipulation, et cela après 5 jours de culture, soit être transférés dans des receveuses synchrones après 7 jours de développement.

Résultats

Dans un premier temps, pour des raisons de facilité et d'économie, nous avons débuté nos recherches en utilisant des ovocytes et des embryons donneurs produits *in vitro* (Tableau 2). Malgré des résultats assez décevants cette première partie du travail a permis de mettre au

TABLEAU 2

Résultats du clonage réalisé sans maturation prolongée des ovocytes, à partir d'embryons produits *in vitro*, et transfert des blastomères immédiatement après l'enucléation.

Le contrôle de celle-ci a été réalisé par fixation d'un échantillon, et a montré que 28,8 % des ovocytes n'étaient pas énucléés.

	%	Nb
Clivage	9,4	22/235
Stade VIII	3,4	8/235
Blastocyste	1,7	4/235

TABLEAU 3

Pourcentages de développement en fonction des différents types d'embryons donneurs.

Embryons donneurs	<i>in vivo</i> frais		<i>in vivo</i> congelés		<i>in vivo</i> frais	
	%	Nb	%	Nb	%	Nb
Taux de:						
Énucléation	71,0	406/572	64,0	98/153	72,1	101/140
Clivage	62,4	242/388	58,6	51/87	82,5	71/86
Stade VIII	20,1	81/388	12,6	11/87	31,4	27/86
Blastocyste	12,9	50/388	1,1	1/87	13,9	12/86

point les différents milieux de maturation et de culture, de tester les paramètres de l'électrofusion et enfin de contrôler l'énucléation. Suspectant une viabilité moindre des embryons produits *in vitro*, nous avons continué nos recherches en utilisant des embryons donneurs produits *in vivo*. Cette modification associée aux perfectionnements apportés à la méthode nous a permis d'augmenter de manière sensible les taux de fusion et de clivage qui atteignent respectivement 86,9 % et 62,4 %; les pourcentages de stade VIII et de blastocyste restant respectivement de 20,1 et 12,9 %. Forts de ces résultats, nous avons testé, à nouveau, l'utilisation d'embryons donneurs produits *in vitro* et les résultats obtenus rejoignent ceux enregistrés avec les embryons donneurs produits *in vivo* (Tableau 3).

Les blastocystes obtenus sont viables puisque sur 12 transferts portant sur 19 embryons obtenus à partir de donneurs frais, nous enregistrons 6 gestations dont 2 sont âgées de plus de 8 mois. Un embryon a également été obtenu à partir d'un donneur congelé. Celui-ci, après transfert, a donné lieu à une gestation qui s'est malheureusement soldée par un avortement.

Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation de donneurs congelés produits tant *in vivo* que *in vitro*, s'est toujours révélée fort décevante (Tableau 3).

Discussion

Les progrès accomplis en matière d'énucléation des ovocytes, de synchronisation des cycles cellulaires et de culture *in vitro* d'embryons nous ont permis de réaliser le clonage avec succès.

Les problèmes rencontrés dans la réalisation et le contrôle de l'énucléation ont été en grande partie résolus grâce à l'emploi du bisbenzamide (Hoechst 33342). Ce colorant se fixe spécifiquement et de manière réversible aux bases adénine et thymine de l'ADN. Westhusin et al (1992) ont montré que l'incubation avec ce colorant n'affecte pas la viabilité des embryons pour autant que l'exposition à la lumière ultraviolette soit contrôlée en intensité et en durée. L'introduction de cette vérification dans le protocole expérimental permet un contrôle strict de l'énucléation, et minimise les risques de polyploïdie.

Une grande proportion des échecs du clonage par transfert de noyau s'explique par le manque de synchronisation des cycles cellulaires de l'ovocyte receveur et du blastomère donneur. Nous pouvons difficilement contrôler le cycle cellulaire des blastomères donneurs car, à partir du stade 16 cellules les divisions cessent d'être synchrones. L'aptitude des ovocytes receveurs à intégrer un noyau, quel que soit le stade de son cycle cellulaire, augmente en fonction de la durée de maturation. Heyman et al (1992) ont montré que les taux de clivage et de blastocyste sont plus élevés si l'on augmente la durée de maturation des ovocytes, soit 36 à 41 heures au lieu de 26 à 34 heures. Cette amélioration des résultats peut s'expliquer ou par une augmentation de la compétence des ovocytes, ou par une meilleure synchronisation des cycles cellulaires. En effet, une étude parallèle réalisée en collaboration avec le Professeur Koulisher montre que 24,2 % (22/91) des ovocytes sont encore en métaphase I au terme de la période normale de maturation *in vitro* de 25 heures (Kou-

lisher et al, 1993). D'autre part, la réduction du MPF minimise l'importance de la synchronisation des cycles cellulaires du cytoplaste receveur et du blastomère donneur (Prather et al, 1992; Campbell et al, 1993). En effet, après la maturation, l'ovocyte est arrêté en phase M de son cycle cellulaire par une forte concentration en MPF (Gerhart et al, 1984) qui est responsable de l'entrée de la cellule en division (Masui et Markert, 1971). Il s'ensuit que le transfert d'un blastomère dans un cytoplaste riche en MPF va être suivi du dédoublement de son génome. Seuls les blastomères au stade G1, c'est-à-dire n'ayant pas encore commencé à se diviser, sont donc transférables et donneront lieu à un développement embryonnaire normal. La prolongation du séjour des ovocytes dans leur milieu de maturation avec comme corollaire la réduction de la concentration ovocytaire en MPF, nous a permis de contourner le problème de la synchronisation des cycles cellulaires et d'utiliser les blastomères quel que soit le stade de leur cycle de division.

Le développement des embryons reconstitués doit être conduit jusqu'au stade blastocyste, afin de permettre leur transfert chez des receveuses synchrones. Théoriquement, trois possibilités de développement sont accessibles: le transfert temporaire dans des hôtes intermédiaires, la coculture avec des cellules épithéliales d'oviducte, ou le milieu conditionné par ces mêmes cellules. La technique du transfert dans un hôte intermédiaire a été abandonnée car cette méthode, bien qu'offrant les taux de développement les plus élevés, est lourde du point de vue technique et occasionne la perte d'un grand nombre d'embryons suite à la perforation de la zone pelliculaire. En effet, les contractions tubaires provoquent l'expulsion de l'amas cellulaire par le pertuis laissé lors des micromanipulations. Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation des milieux conditionnés n'a pas été retenue car cette méthode nous a fourni des embryons constitués d'un nombre réduit de blastomères (Ectors et al, 1993). Nous avons préféré la troisième possibi-

lité, à savoir le développement des embryons en co-culture en présence de cellules épithéliales flottantes. Le contact entre ces dernières et l'embryon mime assez fidèlement les conditions présentes dans l'oviducte, tout en évitant les détériorations de l'embryon suite aux contractions tubaires. L'efficacité de ce type de co-culture a été démontrée aussi bien pour la production d'embryons *in vitro*, le développement d'embryons micromanipulés et de morulas donneuses de blastomères (Tableau 3).

La possibilité d'utiliser les embryons produits *in vitro* comme donneurs de blastomères est un acquis important car elle augmente de façon considérable l'efficacité du clonage en permettant la production d'un grand nombre d'embryons donneurs, une meilleure programmation du travail et surtout d'utiliser les embryons re-

constitués comme donneurs pour un second cycle.

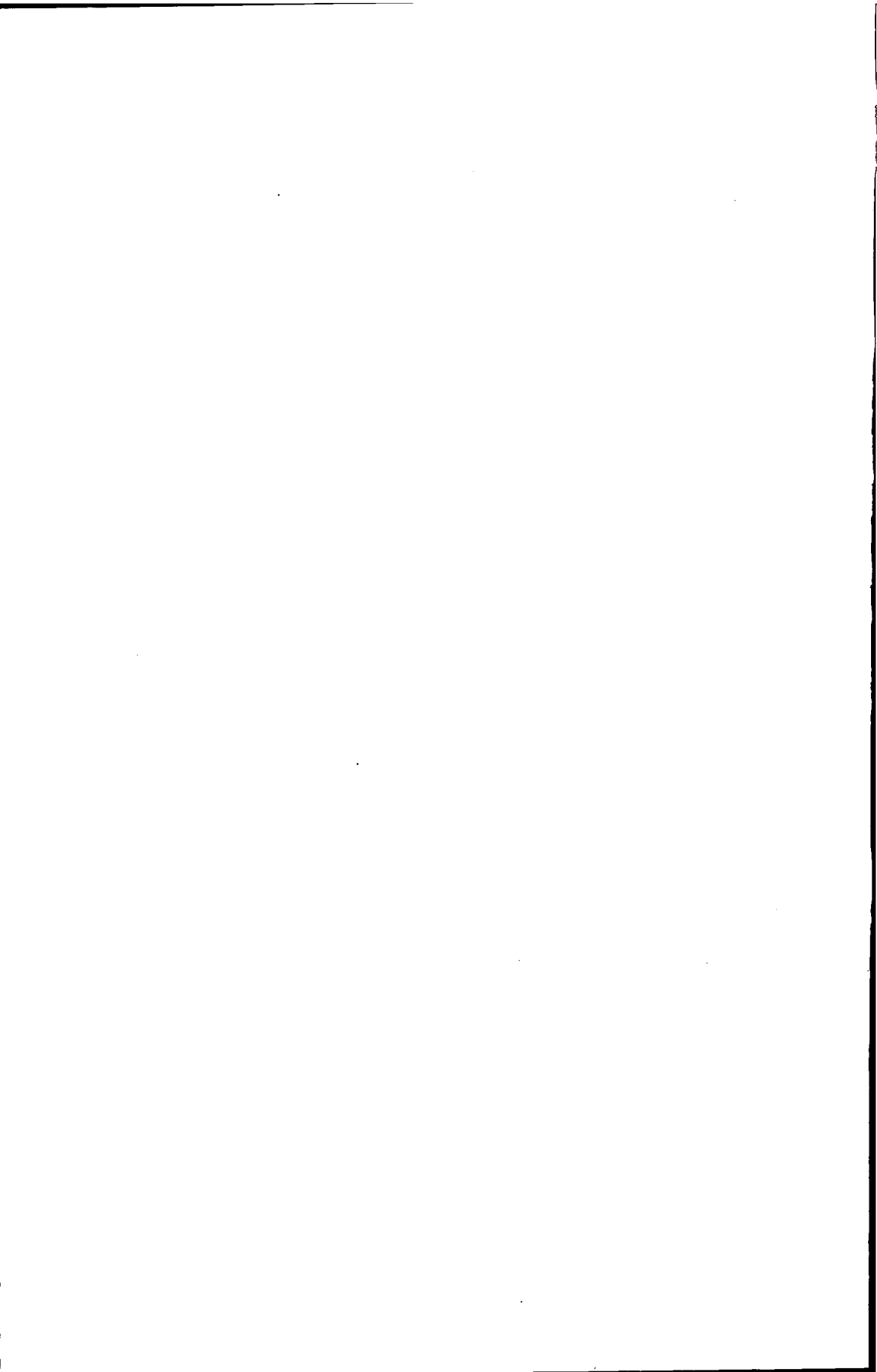
En conclusion, les données présentées dans cet article montre l'état d'avancement de la recherche en Belgique sur le clonage par transfert de blastomère. Ces constatations démontrent que la production d'embryons bovins par clonage n'est pas encore parfaitement définie, pour que la méthode acquière son développement optimal, certaines limitations devront être surmontées, notamment en ce qui concerne la maturation des ovocytes et la synchronisation des cycles cellulaires. En attendant, la méthode devient accessible aux généticiens dans la gestion des schémas de sélection, et il faudra en tenir compte pour l'orientation future des programmes de multiplication des individus, des races ou des espèces d'intérêts zootechniques ou écologiques.

SUMMARY

In 1987, Prather et al. have performed the first embryo cloning by nuclear transfer in the bovine species. Since, many researchers tried to develop and to apply the technique. While the enucleation of the recipient oocyte, the injection of the donor blastomere and the fusion procedure are now well controlled; the maturation and the activation as the development and freezing of the cloned embryos need to be more investigated. An increase in embryonic mortality is also observed after transfer in a recipient cow. Nevertheless, 10% of the cloned embryos develop *in vitro* to the blastocyst stage and give pregnancies after transfer.

BIBLIOGRAPHIE

- BONDIOLI K.R. Nuclear transfer in cattle. *Proc. Int Symposium Anim. Biotech.*, Oct. 1991, Kyoto Japan.
- BRIGGS R., KING T.J. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1952, 38, 455-463.
- CAMPBELL K.H.S., RITCHIE W.A., WILMUT I. Disappearance of maturation promoting factor activity and the formation of pronuclei in electrically activated *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 1993, 33, 199.
- CLEMENT-SENCEWALD A., PALMA GA, BERG U., BREM G. Comparison between *in vitro* produced and *in vivo* flushed donor embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology*, 1992, 37, 196.
- ECTORS F.J., THIONON F., DELVAL A., FONTES R.S., TOUATI K., BECKERS J.F. and ECTORS F. Comparison between culture of bovine embryos *in vitro* versus development in rabbit oviducts and *in vivo*. *Liv. Prod. Sci.*, 1993, 36, 29-34.
- GERHART I., WU M., KIRSCHNER M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus Laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol.*, 1984, 98, 1247-1255.
- HEYMAN Y., CHESNE P., RAO VII., MARCHAL J., CAMOUS S., RENARD JP. Gestional profile of recipient heifers following transfer of *in vitro* produced cloned blastocyst. 8e Réunion AETE 11-12 sept 1992 Lyon: Méricieux éd, 1992, 164.
- HEYMAN Y., CHESNE P., RENARD JP. Transplantation de noyaux et obtention de clones chez les mammifères domestiques. *Rec. Méd. Vét.*, 1991, 167, 315-322.
- KOULISCHIER L., ECTORS F.J., JAMMAR M., HERENS C., BECKERS J.F. Chromosome studies of bovine oocytes matured *in vitro*. Accepted for oral presentation in VIII World Congress on In Vitro Fertilization and Alternate Assisted Reproduction, 15 September 1993, Kyoto.
- MASSIP A., VAN DER ZWALMEN P., MULNARD J., ZWIJSEN W. Atypical hatching of a cow blastocyst leading to separation of complete twin half blastocysts. *Vet. Rec.*, 1983, 112, 301.
- MASUI Y., MARKERT C.L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. exp. Zool.*, 1971, 177, 129-146.
- Mc GRATH J., SOLTER D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, 220, 1300-1302.
- PRATHER R.S., BARNES F.L., SIMS M.M., ROBL J.M., EYESTONE W.H., FIRST N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 1987, 37, 857-866.
- PRATHER R.S., STUMPF T.T., RICHARDS L.F. Reprogramming the nucleus and synchronizing it with the cytoplasm. Proceedings of the symposium on cloning mammals by nuclear transplantation 26-28, 15 January 1992, Fort Collins.
- RENARD J.P., HEYMAN Y. La multiplication par clonage : un nouvel outil pour la sélection animale. *Cahiers Agricultures*, 1992, 1, 309-316.
- TOUATI K., ECTORS F. Congélation de demi-embryons par la méthode au glycérol-sucrose et transfert direct: premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 1991, 135, 287-289.
- WESTHUSIN M.E., PRYOR J.H., BONDIOLI K.R. Nuclear transplantation in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991, 28, 119-123.
- WESTHUSIN M.E., LEVANDUSKI M.J., SCARBOROUGH R., LOONEY C.R., BONDIOLI K.R. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J. Reprod. Fert.*, 1992, 95, 475-480.
- WILLADSEN S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, 320, 63-65.
- WILLADSEN S.M., JANZEN R.E., McALISTER R.J., SHEA B., HAMILTON G., McDERMAND D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 1991, 35, 161-170.



VIABILITY OF CLONED BOVINE EMBRYOS AFTER ONE OR TWO CYCLES OF NUCLEAR TRANSFER AND IN VITRO CULTURE

F.J. Ectors,¹ A. Delval,¹ L.C. Smith,² K. Touati,¹ B. Remy,¹ J-F. Beckers¹
and F. Ectors¹

¹Dept. of Animal Endocrinology and Reproduction
Faculty of Veterinary Medicine University of Liege
B-4000 Liege, Belgium

²Centre de Recherche en Reproduction Animale, Faculté de Médecine Vétérinaire,
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Received for publication:

Accepted:

ABSTRACT

A completely in vitro procedure for cloning and recloning bovine embryos has been developed. Embryos obtained by IVM/IVF/IVC developed to the morula stage were used as blastomere donor in conjunction with IVM recipient oocytes. Reconstructed embryos were developed in vitro in co-culture using bovine oviductal epithelial cells. Resulting morulae were used as donor for recloning in similar experimental conditions. No significant difference was observed between cloning and recloning in terms of development (rates of blastocyst: 12.9% versus 14.9%) nor in the number of nuclei per blastocyst (63.8 versus 49.1) and finally in pregnancy rates (35.7% versus 33.3%). The high variability observed between replicates and the correlation between results in first and second cycle nuclear transfer may suggest an inherent potential of individual donor embryos to support development by cloning.

Key words: nuclear transfer, bovine, embryo, in vitro culture, in vitro fertilization.

INTRODUCTION

Development of reproducible cloning methods in mammals is of considerable scientific and economic interest. Due to the relatively small number of offspring obtained after a single cycle of nuclear transfer (NT), some authors have suggested the use of viable reconstructed embryos as donors for second or additional cycles of NT. Recloning of mammalian embryos has been reported by Willadsen et al (9), Westhusin et al (8) and Stice and Keefer (7). The latter authors have described the obtention of live calves after three generations of NT.

Acknowledgements:

This work was supported by an IRSIA grant.

Reports on the potential of preimplantation development of nuclear transplanted bovine embryos have varied considerably within and between laboratories. Two main factors might account for this variability: donor and recipient cell cycle compatibility (1) and/or partial ability of the recipient cytoplasm to dedifferentiate the donor nucleus. In addition, Stice and Keefer (7) have postulated that some donor embryos may have an intrinsic potential to support proper development after multiple NT.

We described a NT procedure in conjunction with an in vitro embryo culture. Donor embryos were produced by IVM, IVF and in vitro culture. Development of reconstituted embryos was performed in vitro in coculture with bovine oviductal epithelial cells. Some of these reconstituted embryos were used as donors for recloning. After such procedures, a limited number of embryos were evaluated in vitro by nuclear counting. Relatively large numbers of first and second cycle NT blastocysts were transferred into synchronous recipient heifers in order to evaluate their ability to induce ongoing pregnancies.

MATERIALS AND METHODS

Two experiments were conducted: in experiment one, first cycle NT embryos were produced, while in the second experiment the first cycle reconstructed morulae were used as donor embryos for recloning.

Micromanipulations

In vitro maturation of oocytes and in vitro fertilization of donor embryos have been previously described (2). Micromanipulations were carried out on an inverted Nikon Diaphot microscope at 100x magnification equipped with Leitz mechanical micromanipulators. All the micromanipulation procedures were performed at 25-30°C, in 250 μ L droplets under oil (light mineral oil, Sigma: M-3516).

Oocyte enucleation. After 24 h of IVM, expanded oocyte-cumulus complexes were placed in calcium and magnesium free PBS medium supplemented with hyaluronidase (300 iu/ml; Sigma: H-3506) and vigorously shaken for 5 min (vortex) to remove the cumulus cells. Denuded oocytes with an homogeneous cytoplasm and a first polar body were selected as recipient cytoplasms.

These oocytes were placed in PBS added with 10% fetal calf serum (FCS: Sebak: ref.: 30.01.21) containing cytochalasin B (7.5 μ g/ml; Sigma: C-6762) 10 min before starting the micromanipulations. For enucleation of oocytes, a small amount (\approx 1/3) of cytoplasm adjacent to the first polar body and the first polar body itself was removed by aspiration. Immediately after enucleation, the micromanipulated oocytes were incubated at room temperature in PBS containing 10% FCS and H \ddot{a} chst 33342 (5 μ g/ml; bisbenzimidazole trihydrochloride, Sigma: B-2261) for 10 min. After staining, the micromanipulated oocytes were rinsed in fresh PBS added with 10% FCS and then examined individually at 100X magnification with a Nikon TMD Diaphot inverted microscope equipped with an epifluorescence detector. A 100 W mercury lamp (Osram, Germany) and an ultraviolet filter block (365 nm excitation and 400 nm emission, UV-1A, Nikon) were used to irradiate the oocytes. Exposition of oocytes to UV light lasted no more than 5 sec. Only oocytes with no observable chromatin were considered as correctly

enucleated, and were then used as recipient cytoplasm for an isolated blastomere. Enucleated oocytes were then returned to maturation medium at 39°C until 44 to 46 h post-onset of IVM.

Donor embryos. In experiments 1 and 2, donor embryos were used on Day 5 after IVF (Day 0 = IVF); in experiment 2, morulae were used on Day 6 after first cycle NT for recloning (Day 0 = Day of enucleation). After selection, they were incubated in calcium and magnesium free PBS + 10% FCS containing cytochalasin B (7.5 µg/ml) for 10 min. Each donor was placed individually in a 25 µl droplet under oil. The embryonic cell mass was mechanically removed from its zona pellucida with a glass needle mounted on a micromanipulator. The blastomeres were disaggregated by gentle pipetting throughout a calibrated holding pipette (inner diameter: ≈30 µm).

Injection and fusion. Immediately after the disaggregation of the donor morula, an appropriate number of recipient cytoplasm were added to the droplet containing the isolated blastomeres. Single blastomeres isolated from about 32-cell embryos were inserted into the perivitelline space of enucleated oocytes. Injection was performed via the hole remaining in the zona pellucida from the day before. Recipient oocyte-blastomere pairs were transferred to the electrofusion medium: 0.275 M mannitol (Sigma, ref.: M-1902) added with 0.1 mM MgSO₄·7H₂O (Sigma, ref.: M-7774) and 0.05 mM CaCl₂ (Sigma, ref.: C-7902). The pairs were gently placed in a home-made fusion chamber with two platinum parallel electrodes 240 µm apart. A direct current pulse of 2.7 kVolts/cm was applied for 50 microsec. An electric fusion processor was used as pulse generator (Jouan, CHT 1287). Stimulated pairs were immediately incubated in co-culture after the electrofusion procedure.

Embryo Development

The bovine oviducts were recovered at a local slaughterhouse from normally cycling heifers presenting a corpus luteum. They were carried to the laboratory in saline at 0°C within 1 h. After dissection, the fallopian tubes were sterilised by immersion in ethanol for a few seconds and then washed three times in saline. The scratching of the oviductal mucosae was performed using a glass microscope slide. After washing the cells five times in PBS + 10% FCS, they were cultured for 24 h in TCM 199 supplemented with 20% FCS and antibiotics/antimicotic preparation (penicillin: 100 iu/ml, streptomycin: 100 µg/ml and amphotericin B: 1 µg/ml - Gibco: 600-5245AE). Before use for embryo culture, they were washed twice in PBS + 10% FCS to remove the dead cells. After washing, the tissue pellet was resuspended in Menezo B2 medium (tissue/medium ratio of 1/50) supplemented with 20% heat treated pro-estrus cow serum (Day 20), pyruvate (30 µg/ml), antibiotics (penicillin: 100 iu/ml, streptomycin: 100 µg/ml). The zygotes or reconstructed embryos were cultured in 50 µl droplets of tissue suspension under oil.

Blastocyst quality obtained from first and second cycle NT was assessed in vitro by nuclear counting or in vivo by their ability to induce gestation in synchronized heifers.

Blastocyst fixing and staining. On Day 7, part of the blastocysts was fixed in ethanol/2.3% NaCitrate (1/3: v/v) to determine cell number based on the nuclear counts after staining with Hœchst 33342 (10 µg/ml).

Embryo transfer. Red Holstein heifers were synchronised by injecting (i.m.) 750 µg (3 ml) of cloprostenol (Estrumate, Pitman-Moore) about 60 h before the onset of desired estrus. Blastocysts obtained in co-culture after NT were transferred non-surgically to recipient heifers 7 d after estrus. Two embryos of comparable quality from the same blastomere donor were transferred together into the recipient's uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. Pregnancies were diagnosed on Day 35 by pregnancy associated glycoprotein (PAG) determination (Zoli et al, 1992). All pregnant recipients were examined after 90 d of gestation by rectal palpation in order to control the ongoing pregnancy.

Statistical Analysis

Data were analysed by chi-square (Tables 1 and 2) and of Student t-test (Tables 3 and 4). Correlations between development after first and second cycle NT were also assessed.

RESULTS

Experiment 1: First Cycle NT

On average, 19.1 (248/13) reconstructed NT embryos were obtained per donor. The development potential of first cycle nuclear transferred embryos was compared to that of embryos produced by IVF (Table 1). Although similar cleavage rates were obtained in both groups, first cycle reconstructed embryos had significantly lower development rates to VIII-cell and later development stages ($p < 0.01$). Moreover, substantially higher standard errors and wider ranges were obtained in the reconstructed embryos, indicating a large variability in this group, compared to IVF embryos.

Table 1. Percentage of embryos developed after IVF and first cycle NT.

	Mean % \pm SEM	Range	Number	Replicates
IVF:				
Cleaved (Day 3)	76.0 \pm 4	60 to 86	(511/672)	6
VIII-cell stage (Day 3)	49.1 \pm 4	34 to 59	(330/672)	6
Morula (Day 5)	21.4 \pm 4	20 to 43	(144/672)	6
1st cycle NT:				
Cleaved (Day 3)	68.7 \pm 15	35 to 83	(170/248)	13
VIII-cell stage (Day 3)	21.8 \pm 16	0 to 41	(54/248)	13
Blastocysts (Day 7)	12.9 \pm 10	0 to 27	(32/248)	13

Experiment 2: Second Cycle NT

The mean number of reconstructed embryos obtained per donor was similar in first (228/11) and second (303/15) cycle NT (20.7 versus 20.2; NS: $p > 0.05$). As shown in experiment 1, cleavage rate in IVF was similar to that in first and second cycle NT; whereas the development to VIII-cell and later stages was significantly lower in both reconstructed groups (Table 2).

No significant difference was observed at any stage between first and second cycle nuclear transferred embryos. Standard errors and ranges observed in the reconstructed embryos were also higher than in the IVF group. No difference in these parameters was observed between first and second cycle NT groups, indicating that increased variability observed after cloning was not influenced by a recloning procedure.

In order to evaluate a possible donor effect, first cycle NT embryos obtained in experiment 2 were classified according to the development rate (Table 3). In table 3, when the first cycle NT embryos obtained in experiment 2 were classified according to the development rate, there was evidence of a possible donor effect but the correlation between first and second cycles was weak.

Table 2. Percentage of embryos developed after IVF, first and second cycle NT.

	Mean % \pm SEM	Range	Number	Replicates
IVF:				
Cleaved (Day 3)	76.5 \pm 10	60 - 86	(485/634)	5
VIII-cell (Day 3)	48.4 \pm 11	34 - 59	(307/634)	5
Morula (Day 5)	23.8 \pm 6	20 - 35	(151/634)	5
1 st cycle NT:				
Cleaved (Day 3)	86.8 \pm 17	41 to 92	(198/228)	11
VIII-cell (Day 3)	22.8 \pm 10	8 to 36	(52/228)	11
Morula (Day 6)	14.5 \pm 12	0 to 30	(33/228)	11
2 nd cycle NT:				
Cleaved (Day 3)	78.2 \pm 7	66 to 89	(237/303)	8
VIII-cell (Day 3)	28.7 \pm 9	18 to 43	(87/303)	8
Blastocysts (Day 7)	14.9 \pm 12	0 to 41	(45/303)	8

Two tests were performed to evaluate the quality of first and second cycle nuclear transferred blastocysts obtained in the experiments 1 and 2 described above. Some embryos

were fixed and stained in order to determine their nuclear number (Table 4), while others were non surgically transferred to recipient heifers (Table 5).

A reduced number of nuclei was observed in blastocysts from nuclear transferred embryos when compared to IVF ($p < 0.0005$). Moreover, the number of nuclei observed in recloned blastocysts was also reduced when compared to first cycle NT, but the results were not significantly different ($p > 0.05$). The absence of a quality difference between cloned and recloned blastocysts was confirmed by the very similar rates of pregnancies obtained in the two groups (Table 5).

Table 3. Developmental potential of cloned embryos.

Donors	First cycle		Second cycle	
	No. & % of Morulae (Day 6)		No. & % of blastocysts (Day 7)	
	No.	%	No.	%
1	9/30	30.0	9/56	16.1
2	6/22	27.3	15/37	40.1
3	5/26	19.2	2/33	6.1
4	4/22	18.2	1/10	10.0
5	3/21	14.3	6/37	16.2
6	2/17	11.8	6/40	15.0
7	3/30	10.0	6/43	14.0
8	1/11	9.1	0/47	0.0
9	0/12	0.0	/	/
10	0/15	0.0	/	/
11	0/22	0.0	/	/
Totals	33/228	14.5	45/303	14.9

Parent donor embryos have been classified in function of their developmental rate after first cycle NT.

Correlation between 1st and 2nd cycles NT: $r^2 = 0.58$; NS: $p = 0.13$.

A total of 11 calves were obtained in the first and the second experiments. All of them were morphologically normal and presented normal karyotypes. In the second cycle NT group, we noted the obtention of clones of male twins and female triplets.

Table 4. Number of nuclei in IVF, 1st and 2nd cycle nuclear transferred Day 7 blastocysts.

	Mean No. of nuclei (\pm SEM)	Range	No. of fixed blastocysts
IVF	105.2 \pm 3.21	69-148	48
Exp. 1 (1st cycle NT)	63.8 \pm 4.9	35-135	25
Exp. 2 (2nd cycle NT)	49.1 \pm 5.0	30-83	11

Table 5. Percentage of pregnancies following transfer of 2 blastocysts from 1st and 2nd cycle NT (a).

	Day 35	Day 90	Term	Newborn ^b
Exp. 1 (1st cycle NT)				
%	50.0	50.0	35.7	21.4
No.	7/14	7/14	5/14	6/28
Exp. 2 (2nd cycle NT)				
%	50.0	33.3	33.3	20.8
No.	6/12	4/12	4/12	5/24

a: All recipients heifers received two embryos from the same clone.

b: No. calves / No. of transferred embryos.

DISCUSSION

Our results demonstrate that viable multiple generation NT embryos can be obtained through a completely in vitro procedure for cloning and re-cloning in bovine. Previous reports on multiple generation NT have shown that second or more generations of NT embryos can be produced when using in vivo donor embryos and by culturing the NT embryos in oviducts of intermediate hosts, either sheep or rabbit (8;7). Developmental rates to the blastocyst stage similar to those reported using in vivo procedures have been obtained in vitro (3), suggesting that temporary passages in the reproductive tract of NT embryos is not necessary. In vitro derived donor embryos have previously been shown to support the development of single generation NT embryos with a potential to produce live offspring (5;10;3). Although some authors have reported reduced development from in vitro donor embryos (10), others have shown similar development rates of NT embryos derived from in vitro and in vivo donor embryos (2;3).

Significantly lower developmental rates and nuclei numbers count in blastocyst were observed in both first and second cycle NT derived embryos when compared to IVF. This loss in potential may, however, not be always present since others have shown similar rates of development between first cycle NT and IVF embryos (3). In agreement with findings by Westhusin et al (6) and Stice et al (5), our experiments show no change in development potential between first and second generation clones. All three viability parameters studied, i.e. blastocyst development rates, nuclei number in Day 7 blastocysts and pregnancy rates, showed a remarkable similarity between both NT groups, indicating that viability is not affected by a second round of NT. These findings contrast to those reported by Stice and Keefer (5) and Westhusin et al (7) who showed decreased development in second cycle NT embryos. It is somewhat surprising that an embryo, or its genome, can remain viable after being cultured entirely in vitro for up to 18 days (2nd cycle NT). In addition to the prolonged in vitro culture period, second cycle NT embryos undergo two cycles of micromanipulation which comprise exposure to conditions such as low temperature, UV irradiation, microsurgery, cytoskeletal inhibitors and electric pulses. Cytoplasm and plasma membrane, however, are renewed at each cycle of NT, bringing, apart from these non-genetic components, a "fresh" (viable) post-transcriptional machinery to enable several cleavage divisions at limited or no expense of the transplanted nucleus. On the contrary, repeated exposure of the chromatin to reprogramming factors in the cytoplasm of oocytes may, after all, enhance developmental potential as indicated in amphibian (6). In support of this notion, Stice and Keefer (5) reported a rebound in development rates after third and fourth cycle of cattle NT (5). The latter, however, appear to produce lower pregnancy rates and live offspring.

Like Westhusin et al (6) and Stice and Keefer (5), a large variability in the percentages of blastocyst was observed between first and second cycle. In our study, the between replicate variability (expressed in coefficient of variation: CV) for in vitro blastocyst development was low in the IVF programme (19% and 25%). In contrast, after cloning it increased greatly but it was not amplified in second cycle compared with the first one (80.5% versus 77.5%). As noticed by others (7), the origin of such inter-replicate variability remains unclear. A nuclear donor effect is most likely to cause inter-replicate variation due to the small number of donor embryos used at any micromanipulation session. As suggested by Stice and Keefer (5), nuclei from different embryos may have variable intrinsic potential to support development after NT. Such intrinsic potential of donor embryos should be transmitted through generations of multiple NT, leading to a clonal family effect. In our study, a positive correlation ($r^2=0.58$) but not significant ($p=0.13$) was observed between the development of first and second cycles of NT embryos. However, since clonal families that produced no embryos in first NT cycles provide no information for second generation, it is possible that this correlation value is biased. If we assume that the donor embryos which are unable to support development at a first cycle are also unable to do so in second cycle NT, the resulting correlation value is higher ($r^2=0.74$) and significant ($p<0.01$). Moreover, clustering of our clonal families into high (21 to 30%; donors 1 and 2), average (11 to 20%; donors 3 to 7) and low (0 to 10%; donors 8 to 11) groups at first cycle NT indicates that, with a few exceptions, the development of most second cycle NT embryos remained in the same group or fall in the group just below (Table 3). Further investigations are required to determine whether a clonal family effect is present in NT, and whether these donor embryos could be identified prior to the cloning procedure. Screening of

good donor embryos would allow the production of larger numbers of genetically identical embryos and lead to a substantial improvement to the efficiency of the procedure for embryo cloning in cattle.

REFERENCES

1. Collas P, Balise JJ, Robl JM. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1992; 46:492-500.
2. Ectors FJ, Thonon F, Delval A, Fontes RS, Touati K, Beckers J-F. Comparison between culture of bovine embryos in vitro versus development in rabbit oviducts and in vivo. *Liv Prod Sci* 1993; 36:29-34.
3. Heyman Y, Chesné P, Lebourhis D, Peynot N, Renard JP. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: in vivo versus in vitro. *Theriogenology* 1994; 42:695-702.
4. Keefer CL, Stice SL. In vitro culture of bovine nucleus transfer embryos. *Biol Reprod* 1992; 46:166.
5. Kinis A, Vergos E, Gallagher M, Gordon I. Factors affecting nuclear transfer in cattle using oocytes and embryos produced by in vitro culture. *J Reprod Fertil* 1991; Suppl. 43:261-262.
6. Orr NH, DiBerardino MA, McKinnel RG. The genome of frog erythrocytes displays centuplicates replications. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:1369-1373.
7. Stice SL, Keefer CL. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol Reprod* 1993; 48:715-719.
8. Westhusin ME, Pryor JH, Bondioli KR. Nuclear transplantation in the bovine embryo: a comparison of 5-day, 6-day, frozen thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol Reprod Dev* 1991; 28:119-123.
9. Willadsen SM. Cloning sheep and cow embryos. *Genome* 1989; 31:956-962.
10. Yang X, Jiang S, Farrell P, Foote RH, McGrath AB. Nuclear transfer in cattle: effect of nuclear donor cells, cytoplasm age, co-culture and embryo transfer. *Mol Reprod Dev* 1993; 35:29-36.
11. Zoli A, Guilbault LA, Delahaut P, Ortiz WB, Beckers J-F. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod* 1992; 46:83-92.



CYTOGENETIC STUDY OF BOVINE OOCYTES MATURED IN VITRO

F.J. Ectors,¹ L. Koulischer,² M. Jamar,² C. Herens,² A. Verloes,² B. Remy¹
and J-F. Beckers¹

¹ IRSIA Research Unit, Dept. of Animal Endocrinology and Reproduction
Faculty of Veterinary Medicine

² Human Genetic Center, Faculty of Medicine
State University of Liège, Sart-Tilman, Belgium

Received for publication:

Accepted:

ABSTRACT

Described in the present paper is a cytogenetic study of bovine oocytes matured in vitro. The cumulus-oocyte complexes (COC), punctured from ovaries recovered in a local slaughterhouse, were classified into 3 groups according to follicular diameter: 1 to 4mm, 5 to 8mm and 9 to 13 mm. Metaphases available for observation were classified as metaphase I, haploid and diploid metaphase II. High levels of haploid metaphases II (90.6, 86.9 and 94.4 %) among the 3 groups of follicular sizes indicated successful meiotic resumption during in vitro maturation and suggested that cytoplasmic maturation may be responsible for low developmental rate after IVM, IVF and in vitro development (IVD).

Key words: in vitro maturation, meiotic chromosomes, bovine oocytes, in vitro fertilization

INTRODUCTION

It is well established that 0.7% of all living human newborns are carriers of a chromosomal rearrangement (17). Chromosome anomalies are also a major cause of embryonic, fetal and neonatal death (12). In other mammalian species, chromosomal disorders seem relatively rare, but little information is available concerning the role of chromosomal disorders in embryonic wastage. During the last decade, in vitro methods became available for both human and animal reproduction. In vitro fertilization now offers the opportunity to study the karyotype of gametes or early embryos. However, for various reasons, systematic karyotype analysis of human oocytes has not been undertaken. Human female meiotic chromosome studies for instance, concern mainly oocytes matured in vivo, which remain unfertilized in IVF programs for instance. Anomaly rates for 1897 metaphase II, based on analyses of 15 reports, ranged from 3 to 57.1%, for a mean of 22.9%, according to Pellestor (10). In a recent study, the anomaly rate was still higher, reaching 58.7% (1). In vitro-matured human oocytes show nuclear degeneration and gross chromosome anomalies; however, accurate counting has proven to be difficult (13).

Acknowledgments

This work was supported by IRSIA and FNRS grants.

In the bovine species, IVF is generally preceded by the IVM of oocytes aspirated from antral follicles (1 to 15 mm). The organization of the procedure into different successive, well-delimited steps allows for the study of oocytes or zygotes after each step (maturation, fertilization, and the like).

Time sequence of meiotic division and accurate chromosome counting in bovine oocytes matured in vitro was first described by Jagiello et al. (6) and Süss et al. (14). Yadav et al. (19) studied the chromosome complement of bovine oocytes after IVM. However, these earlier studies did not classify the oocytes according to the follicular size. Indeed, recent studies in the cow (2, 9), ewe (8), and goat (3) have shown that follicular diameter is correlated with oocyte ability to mature, to be fertilized and to develop into an embryo.

The aim of the present study was to correlate karyotypic observations of in vitro matured oocytes and follicular diameter observed at the moment of the aspiration.

MATERIALS AND METHODS

Collection of Cumulus-Oocyte Complexes

Ovaries of adult cows were collected from a local abattoir. Thirty minutes after slaughter, they were placed in a saline solution at 30°C and brought to the laboratory within 1 h. Cumulus-oocyte complexes (COC) were collected from follicles of different sizes. The first follicles were dissected and measured with a calliper; later follicle sizes were visually estimated. Follicles were classified according to their diameter into 3 groups: from 1 to 4 mm, 5 to 8 mm and 9 to 13 mm. The 3 groups were treated separately. Follicular contents were collected in 50-ml conical tube. After 15 min of sedimentation, the COCs were isolated from the follicular fluid by washing in TCM 199 solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) added with 25mM hepes (Life Technologies, Paisley, Scotland), and 3 mg/ml bovine serum albumin (BSA, Sigma) to remove meiotic inhibition. This last step was considered to be the start of IVM.

In Vitro Maturation

Cumulus-oocyte complexes with an intact unexpanded cumulus and evenly granulated cytoplasm were washed 3 times in TCM 199 hepes BSA. For each group, a maximum of 40 COCs were incubated for 24 to 25 h at 39°C in humidified air atmosphere with 5% CO₂ / ml of maturation medium was composed of TCM 199 supplemented with 20% heat treated proestrous cow serum (D20), 0.25mM pyruvate, 5.0 µg/ml LH (LH: 1.0xNIH-LH-S1), 0.5 µg/ml FSH (FSH: 75xNIH-FSH-S1), and antibiotics (penicillin: 100 I.U./ml of medium and streptomycin: 100µg/ml of medium).

Chromosome Preparation

A modified method of Tarkowski (16) was used for chromosome preparation. Oocytes were transferred into a hypotonic KCl solution (850 mg/100ml) at 30°C for 5 to 10 min, then placed on a standard slide. Ice-cold fixative (methanol; acetic acid, 2:1) was added carefully, and oocytes were placed under a stereo microscope, the slide was then allowed to dry.

Microscope Observation

Cells were stained with acetic orcein and were examined with a Zeiss microscope and a x100 oil immersion objective lens (eye pieces: x10). All meiotic divisions were observed. The meiotic stage, metaphase I or II and ploidy were recorded. Microphotographs were made of the unclear figures to determine, after enlargement of photographic prints, the meiotic stage or ploidy, or in well-spread metaphases, to accurately count bivalents or chromosomes (Figure 1).

Statistical Analysis

Differences between groups were analyzed for significance by the Chi-square test.

RESULTS

A total of 903 follicles was punctured from the ovaries, and the COCs were divided into 3 groups according to follicular diameter. After IVM, the follicles were fixed, and 587 (65%) were recovered while only 376 (42%) were available for observation (Table 1).

Table 1. Number of oocyte metaphases available after IVM and fixation

Follicle diameter (mm)	No. of oocytes cultured	No. of fixed metaphases	No. of metaphases suitable for observation
1 to 4	467	291	170
5 to 8	186	118	99
9 to 13	250	168	107
Total	903	577	376

Among the metaphases available for observation, no significant difference ($P>0.05$) was observed in terms of haploid and diploid metaphases II among the 3 groups of follicles (Table 2).

Table 2. Chromosome state after 24 hours of IVM of bovine oocytes recovered on the basis of follicular diameter

Follicle diameter (mm)	Metaphase I % (n)	Haploid metaphase II % (n)	Diploid metaphase II % (n)	Total
1 to 4	7.0 (12)	90.6 (154)	2.4 (4)	170
5 to 8	8.0 (8)	86.9 (86)	5.0 (5)	99
9 to 13	3.7 (4)	94.4 (101)	1.9 (2)	107
Total	24	341	11	376

Figure 1. All oocytes were fixed after 24 to 25 hours of culture and were stained with acetic orcein. a) normal metaphase I, b) haploid normal metaphase II, c) metaphase I showing a few bivalents (arrows) and many unpaired elements, d) diploid metaphase II (Magnification: x100).

DISCUSSION

Normal living calves have been obtained by means of *in vitro* techniques for maturation and fertilization of bovine oocytes, collected from antral follicles after the slaughter of the animal (4). However, in our practice, a blastocyst production rate of about 30% can be expected after IVM, IVF and IVD combined with various developmental regimens such as conditioned medium, bovine oviductal epithelial cells, and temporary transfer into intermediate hosts. This rather low rate suggests a major limitation of oocyte competence, defined as the ability to perform nuclear and cytoplasmic maturation successfully.

Chromosome Anomalies

In the present study, a 2.9% (11/376) rate of abnormal metaphase II was observed. As in humans, these abnormal metaphase II are potentially related to problems with fertilization or embryonic death (11). In a study of the frequency of chiasmata and disjunctional behavior in cow oocytes matured *in vitro*, Jagiello et al. (6) were able to count 102 metaphase II oocytes: 99 of which exhibited 30 chromosomes and 3 which were diploid. In the above study (6), the rate of abnormal metaphase II (3%) was similar to ours (2.9%). The rate of metaphases I after IVM was 6.4% (24/376). These results are similar to those of Xu et al. (18). The presence of a normal metaphase I after 24 h of IVM has been described by Hyttel et al. (5). Twenty-two of the recorded instances of metaphase I were normal, while 2 others showed similar anomalies in 2 oocytes from 2 different ovaries, namely the presence of a few bivalents and several univalents, suggesting early desynapsis (Figure 1c).

Follicle Diameter

No significant difference was observed concerning metaphase I and II among the 3 groups of follicles. We suggest therefore that, in our study, nuclear maturation during IVM was not influenced by follicular diameter. Tan and Lu (15) and Lonergan et al. (7) reported that follicular size influenced the developmental ability of the oocyte. We have also observed, in preliminary experiments, better *in vitro* development with oocytes collected from larger follicles (> 4 mm). Since the karyotype anomalies were not different in the 3 groups, the better development of larger follicles could be related to cytoplasmic factors.

In conclusion, the rate of abnormal metaphases after IVM was relatively low. Moreover, our data showed that follicular diameter does not influence significantly the rate of abnormal metaphases. This suggests that the relatively small percentage of blastocysts obtained after IVM/IVF/IVD is not related to the nuclear maturation. Further studies are needed to evaluate the possible implication of cytoplasmic maturation on the development rate.

REFERENCES

1. Almeida P.A., Bolton V.N. Immaturity and chromosomal abnormalities in oocytes that fail to develop pronuclei following insemination *in vitro*. *Hum. Reprod.* 1993; 8: 229-232.

2. Barnes F., Endebroek M., Looney C., Powell R., Westhusin M., Bondioli K. Embryo cloning in cattle: the use of in vitro matured oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1993; 97: 317-320.
3. Crozet N., Ahmed-Ali M., Dubos M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fert.*, accepted for publication.
4. Ectors F.J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Delval A., Beckers J.F., Ectors F. Maturation et fécondation in vitro chez les bovins: naissance d'un veau. *Ann. Méd. Vét.* 1989; 133, 435-436.
5. Hyttel P., Xu K.P., Smith S., Callesen H. and Greve T. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. *Anat. Embryol.* 1987; 176: 35-40.
6. Jagiello G.M., Miller W.A., Ducayen M.B., Lin J.S. Chiasma frequency and disjunctional behavior of ewe and cow oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 1974; 10: 354-363.
7. Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M.P., Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1994; 37: 48-53.
8. Moor R.M., Trounson A.O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent development capacity. *J. Reprod. Fert.* 1977; 49: 101-109.
9. Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 31: 63-67.
10. Pellestor F. Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. *Hum. Reprod.* 1991; 6: 1252-1258.
11. Plachot M., de Grouchy J., Junca A.M., Mandelbaum J., Salat-Baroux J. and Cohen J. Chromosomal analysis of human oocytes and embryos in an in vitro fertilization program. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1988; 541: 384-397.
12. Plachot M., Popescu P. Chromosome and gene anomalies: Their consequences on reproduction and embryonic development. In: Thibault C., Levasseur M.C. and Hunter R.H.F. (ed) *Reproduction in mammals and man*. Paris, Ellipses, 1993; 715-730.
13. Racowsky C., Kaufman M.L. Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured in vitro: analysis by light microscopy. *Fertil. Steril.* 1992; 58: 750-755.
14. Süss U., Wuthrich K. and Stranzinger. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 1988; 38: 871-880.
15. Tan S.J., Lu K.H. Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology*, 1990; 33: 335 abstr.
16. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966; 5: 394-400.
17. Thompson M.W., Mac Innes R.R., Huntington F.W. *Genetics in medicine*, 5th edition. In: Saunders W.B. (ed); 1991; 201.
18. Xu K.P., Greve T., Smith S., Hyttel P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1986, 27: 505-519.

19. Yadav B.R., King W.A., Xu K.P., Pollard J.W., Plante L. Chromosome analysis of bovine oocytes cultured in vitro. *Genet. Sel. Evol.* 1991; 23: 191-196.

