

Le point sur la production d'embryons bovins in vitro : limitations et perspectives de la recherche

THONON F. ⁽¹⁾, ECTORS F.J. ⁽²⁾, DELVAL A. ⁽²⁾, LENS H. ⁽¹⁾,
TOUATI K. ⁽¹⁾, BECKERS J.-F. ⁽²⁾, et ECTORS F. ⁽²⁾

⁽¹⁾ Centre d'insémination artificielle Linalux, Ciney

⁽²⁾ Service d'Obstétrique et de Physiologie de la Reproduction, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège

Ces recherches ont été subsidiées par la Région Wallonne, l'IRSIA et le FNRS

Manuscrit déposé le 12/08/1993.

HISTORIQUE ET EVOLUTION DES TECHNIQUES DE REPRODUCTION

Ces dernières années, le progrès des connaissances relatives à la biologie des gamètes et à l'embryologie précoce ont engendré une évolution importante des procédés de reproduction chez les animaux domestiques. L'intégration de ces progrès aux techniques d'élevage offre des possibilités nouvelles en terme de sélection et d'échanges internationaux d'animaux de haute valeur génétique.

Depuis plus d'un demi-siècle, l'insémination artificielle s'est implantée en élevage : elle est aujourd'hui universellement répandue et intéressante, dans certains pays, jusqu'à 80 % du cheptel bovin. L'insémination artificielle doit son expansion à la mise au point de milieux de dilution du sperme adéquats et surtout à la découverte de cryoprotecteurs adaptés, permettant la conservation de la semence pendant une période pratiquement illimitée.

La transplantation embryonnaire est d'application plus récente sur le terrain. Rapportée pour la première fois chez la lapine (Heape, 1890), elle est expérimentée chez les espèces domestiques à partir de 1930. C'est un peu plus tard qu'elle est réalisée avec succès chez la vache (Willett et al., 1951). Les recherches se poursuivent alors dans divers centres et la méthode commence à s'implanter dans la pratique à partir de 1970. A cette époque, la cryopréservation des embryons de ruminants n'est pas encore au point. Les échanges internationaux à longue distance utilisent la lapine comme «incubateur vivant» (Adams et al., 1961). Par la suite, les méthodes de congélation des embryons se développent. La naissance du premier veau suite à l'implantation d'un embryon congelé (Wilmot et Rowson, 1973) va donner au transfert embryonnaire son impulsion définitive. A l'heure actuelle, la méthode est réalisée avec succès chez plus de vingt espèces animales mais son champ d'application le plus important reste l'espèce bovine.

RESUME

Les progrès récents relatifs à la biologie des gamètes et à l'embryologie précoce ont engendré une évolution importante des techniques de reproduction chez les animaux domestiques. Parmi ces techniques, la production in vitro d'embryons bovins s'est développée à partir d'ovaires récoltés aux abattoirs, puis cette méthode a été appliquée à des animaux pris individuellement. Cependant, les résultats varient fortement d'un animal à l'autre, en fonction du status physiologique de reproduction et de l'âge du donneur.

Malgré ces limitations, la production in vitro d'embryons bovins peut rendre de grands services aux éleveurs, notamment en cas d'abattage de nécessité. Les recherches se poursuivent dans le but d'augmenter le nombre d'ovocytes obtenus par bête et d'améliorer la capacité des embryons à supporter la congélation.

Les techniques de production in vitro d'embryons (maturation in vitro, fécondation in vitro et développement in vitro) apparaissent plus tardivement. La maturation in vitro est réussie en premier lieu. Des veaux naissent suite au prélèvement d'ovocytes sur des ovaires récoltés aux abattoirs. Les follicules de 2 à 5 mm sont ponctionnés et les ovocytes obtenus subissent la maturation in vitro avant d'être fécondés et développés in vivo (Newcomb et al., 1978).

La naissance du premier veau issu d'une fécondation in vitro est réalisée à partir d'ovocytes maturés in vivo (Brackett et al., 1982). Les méthodes de maturation in vitro (MIV) et de fécondation in vitro (FIV) font alors l'objet de très nombreuses recherches partout dans le monde. Ces recherches sont facilitées par la mise au point de la capacitation in vitro des spermatozoïdes par l'héparine (Parrish et al., 1985).

Le développement d'embryons bovins cultivés in vitro ne dépasse pas le stade 8 cellules (Thibault, 1966), ce qui démontre un blocage des multiplications cellulaires en dehors de l'environnement normal de l'embryon à ce stade, c'est-à-dire l'oviducte. En effet, le transfert temporaire des embryons dans l'oviducte d'un hôte intermédiaire permet leur développement ultérieur. Ce développement est d'abord assuré par le transfert des embryons dans l'oviducte de lapine (Sreenan et al., 1968), puis dans l'oviducte de brebis (Willadsen et Polge, 1981).

C'est chez le mouton que l'on obtient pour la première fois des morulas et des blastocystes produits par une méthode totalement réalisée in vitro, soit maturation, fécondation et culture in vitro (Gandolfi et Moor, 1987). Ces embryons se sont développés au-delà du stade de blocage grâce à la présence dans le milieu de culture de cellules épithéliales tubaires (coculture). Ces travaux sont repris ensuite dans l'espèce bovine (Eyestone et First, 1989). La naissance de veaux est obtenue après culture des embryons en

présence de cellules épithéliales de l'oviducte mais également en présence de produits de sécrétion de ces cellules (milieu conditionné ou MC).

Dans l'ensemble, ces recherches ont permis d'améliorer la connaissance des mécanismes qui sous-tendent chacune des étapes de la production in vitro de l'embryon.

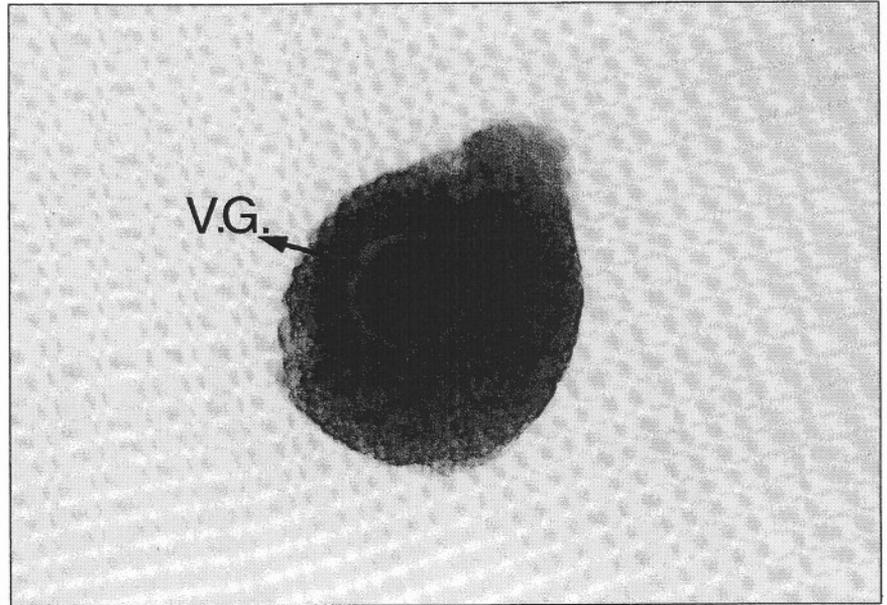


Figure 1
Ovocyte avant maturation in vitro. Seuls les complexes cumulus-ovocytes présentant un cytoplasme ovocyttaire homogène et au moins 4-5 couches compactes de cellules de granuleuse sont sélectionnés pour être maturés in vitro. Noter au sein du cytoplasme la présence de la vésicule germinative (V.G.) que constitue le noyau en prophase de la première division méiotique.

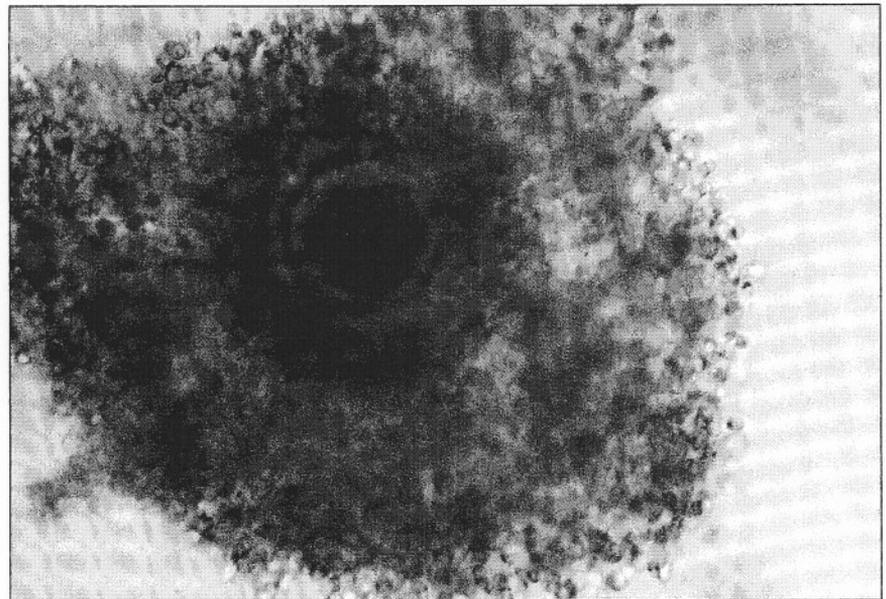


Figure 2
Ovocyte après maturation in vitro. Les cellules de la granuleuse entourant l'ovocyte se sont expansées et ont sécrété une matrice extracellulaire qui assurent leur cohésion. La vésicule germinative a disparu. Le noyau est maintenant en métaphase de la seconde division méiotique.

LES DIFFERENTES ETAPES DE LA PRODUCTION IN VITRO D'EMBRYONS

1) Maturation de l'ovocyte

Avant d'être fécondé avec succès, l'ovocyte doit acquérir la compétence, qui est atteinte avec une taille égale ou supérieure à 80 % de sa taille maximale. Il doit aussi subir des modifications aux niveaux nucléaire et cytoplasmique. Les expériences de fécondation in vitro (Thibault et al., 1975) ont montré que la maturation est importante non seulement pour la fécondation mais aussi pour le développement ultérieur de l'embryon. En d'autres termes, la notion de maturation ovocytaire est aujourd'hui plus complète : elle implique l'acquisition de la capacité, pour l'ovocyte, d'assurer le développement jusqu'au stade blastocyste et l'évolution d'une gestation normale.

La maturation nucléaire consiste en la reprise de la méiose : évolution de la prophase de la première division méiotique à la métaphase de la seconde et émission du premier globe polaire. Cette reprise de méiose se fait spontanément lorsque l'on soustrait un ovocyte compétent de son environnement folliculaire (Thibault et al., 1987). On a pensé dès lors que la maturation in vitro se réaliserait aisément. Mais malheureusement, les expériences ultérieures ont montré qu'à côté de la maturation nucléaire, la maturation cytoplasmique était également extrêmement importante pour le développement ultérieur du conceptus. Cette maturation cytoplasmique rend l'ovocyte capable de décondenser la tête du spermatozoïde et comprend également un remaniement des synthèses protéiques.

Parallèlement aux modifications de l'ovocyte lui-même, les cellules de la granuleuse qui l'entourent s'expandent et sécrètent une matrice extracellulaire gélatineuse (acide hyaluronique) qui assure leurs cohésions (Figures 1 et 2). Les derniers travaux en la matière font apparaître que la maturation ovocytaire au sein du follicule implique non seulement

des interactions entre l'ovocyte et les cellules du cumulus, mais aussi des interactions entre le complexe cumulus-ovocyte et les cellules de la granuleuse périphérique du follicule (Rabahi et al., 1993).

Etant donné le caractère complexe de l'acquisition de la maturation et notre incapacité à établir des protocoles le respectant, à ce jour, la maturation est certainement l'étape la plus limitante de la chaîne des différentes manipulations conduisant à la production in vitro d'embryons bovins. On considère actuellement que les problèmes de maturation expliquent plus de 50 % des échecs de développement (Ectors et al., 1993).

2) Fécondation de l'ovocyte

In vivo, les spermatozoïdes n'acquiescent le pouvoir de fécondation qu'au cours de leur passage dans les voies génitales femelles où, sous l'influence des sécrétions utérines et tubaires, ils subissent la capacitation. Celle-ci agit via un glycosaminoglycan proche de l'héparine (Parrish et

al., 1989), en déplaçant le facteur de décapacitation produit par les voies génitales mâles et recouvrant la tête du spermatozoïde. In vitro, la capacitation peut être induite par l'héparine (Parrish, 1985). Des études réalisées principalement chez la souris (Wassarman et al., 1985) ont démontré que la zone pellucide est composée à 95 % de trois glycoprotéines, organisées en longs filaments interconnectés et dénommées ZP1, ZP2 et ZP3. Des études in vitro de compétition entre spermatozoïdes et chacune de ces trois protéines (Wassarman, 1989) ont fait apparaître que c'est uniquement la glycoprotéine ZP3 qui est reconnue par le spermatozoïde capable, et qu'elle est la seule à déclencher la réaction acrosomique chez celui-ci. Cette réaction consiste en la fusion progressive des membranes plasmique et acrosomique externe du spermatozoïde, avec formation de vésicules membranaires et finalement mise à nu de la membrane acrosomique interne (Piko et Tyler, 1964) (Figure 3). La réaction acrosomique permet la libération des enzymes contenus dans l'acrosome et

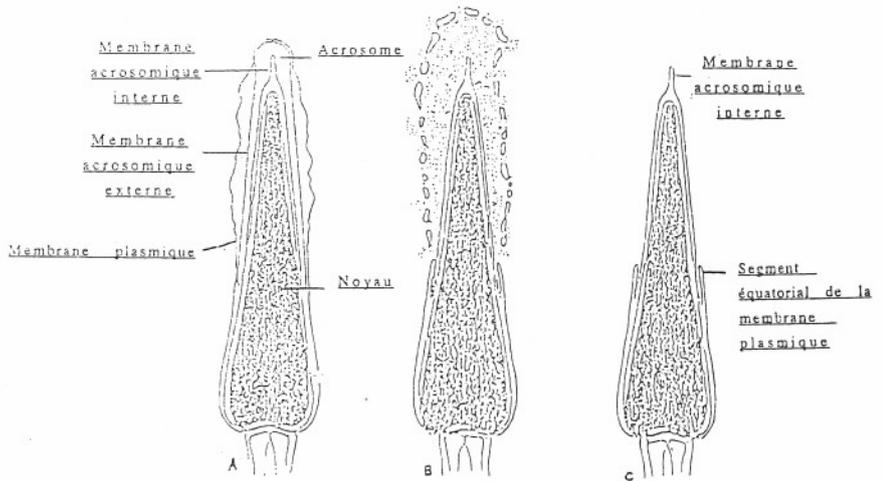


Figure 3

Représentation schématique de la réaction acrosomique du spermatozoïde

A) Avant la réaction acrosomique

L'acrosome, limité par les membranes acrosomiques interne et externe, est intact sous la membrane plasmique.

b) Pendant la réaction acrosomique

Au contact de la glycoprotéine ZP3 de l'ovocyte, les membranes plasmique et acrosomique externe fusionnent. Il y a formation de vésicules membranaires et libération des enzymes acrosomiaux qui vont digérer la zone pellucide.

C) Après la réaction acrosomique

La membrane acrosomique interne est mise à nu. Le segment équatorial de la membrane plasmique du spermatozoïde peut maintenant se fixer à la membrane plasmique de l'ovocyte, entraînant la fusion des gamètes. La membrane acrosomique interne est incorporée au cytoplasme ovocytaire.

exemple deux auteurs pratiquant couramment la ponction échoguidée, on constate que la moyenne d'ovocytes obtenus par récolte et par vache varie de $15,8 \pm 7,8$ (van den Shans et al., 1992) à $5,1 \pm 0,3$ (Pieterse et al., 1991). Cela correspond respectivement à une quantité d'embryons transférables annuellement de 164 (van den Shans et al., 1992) et de 30 (Pieterse et al., 1991). Ces grandes variabilités dans les résultats montrent que les recherches en ce domaine n'en sont encore qu'à leurs débuts.

2) Amélioration de la capacité des embryons produits in vitro à supporter la congélation

Le tableau 4 présente une revue des taux de gestations, suivant le transfert à frais ou après congélation, d'embryons produits in vitro. Lorsque les embryons sont transférés directement dans des receveuses synchrones, sans avoir subi de congélation, le pourcentage de

gestations varie de 31 à 67 %. Ces résultats sont assez proches de ceux obtenus avec des embryons produits in vivo (Leibo et Loskutoff, 1993). Par contre, après congélation, les taux de gestation se situent entre 0 et 50 %. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec les embryons produits in vivo, qui sont de l'ordre de 40-60 % (Niemann, 1991). Les embryons in vitro se révèlent donc moins aptes à supporter la méthode de congélation appliquée aux embryons produits in vivo.

Cette plus grande sensibilité à la congélation pourrait résulter d'un contenu plus élevé en lipides et donc d'une densité embryonnaire moins grande (Leibo et Loskutoff, 1993). Elle pourrait aussi s'expliquer par des jonctions intercellulaires moins fortes et des membranes moins stables. Ces différences entre embryons in vitro et in vivo résulteraient probablement d'une modification du métabolisme (Rieger et al., 1992), due à des conditions de culture pas tout à fait adéquates.

Pour augmenter l'aptitude des embryons produits in vitro à supporter la congélation et à reprendre leur développement, deux possibilités s'offrent aux chercheurs (Leibo et Loskutoff, 1993) : soit modifier la méthode de congélation, pour l'adapter aux caractéristiques particulières des embryons produits in vitro, soit améliorer le système de culture des embryons, de manière à diminuer les différences métaboliques et structurales entre embryons obtenus in vivo et in vitro.

Les adaptations des techniques de congélation couramment employées pour les embryons in vivo (changement de cryoprotecteurs, modifications de la courbe de diminution de la température,...) ne semblent pas, dans l'état actuel de la recherche, augmenter notablement les résultats de survie embryonnaire (Niemann, 1991, Suzuki et al., 1993, Takagi et al., 1993). Les recherches se poursuivent dans différentes directions.

Quant aux modifications des techniques de culture in vitro, différentes solutions sont proposées. Certains auteurs ont tenté de cultiver les cellules d'oviductes sur matrigel de manière à polariser ces cellules et à augmenter leurs sécrétions (Joshi, 1991 et Fontes, 1993). A l'inverse, d'autres chercheurs (Gandolfi et al., 1992, Mermillod et al., 1993) tentent de mettre en évidence et de purifier les protéines spécifiquement sécrétées par l'oviducte. Ceci permettrait de disposer d'un milieu parfaitement défini, ce qui augmenterait la reproductibilité de la méthode.

Comme le montre le tableau 4, les taux de gestation après transfert d'embryons produits in vitro et ensuite congelés varient fortement d'une équipe à l'autre. Ces variations dépendent probablement en bonne partie de la sévérité des critères de sélection des embryons, avant ou après l'étape de cryopréservation. De façon générale, on doit admettre que le rendement actuel global d'une chaîne de production in vitro d'embryons (incluant la

TABLEAU 4

Taux de gestation suite au transfert d'embryons bovins produits in vitro, soit à frais, soit après congélation

Auteurs	Gestations après transfert d'embryons frais	Gestations après transfert d'embryons congelés	Sélection des embryons à transférer
Lu et al., 1990	14/24 (58,3 %) J180	4/8 (50 %) J90	Non mentionné
Reichenbach et al., 1990	66/140 (47,1 %) J35	ND	Stricte avant le transfert (cl 1 et 2)
Roric et al., 1990	ND	0/5 (0 %) J21	Stricte avant le transfert (cl1 et 2). Très stricte après décongélation (conservation de 27 % des embryons)
Xu et al., 1990	12/18 (66,7 %) J35	ND	Stricte avant le transfert (cl1 et 2)
Jiang et al., 1990	2/5 (40 %) J70-90	1/6 (16,7 %) J70-90	Non mentionné
Reichenbach et al., 1990	ND	28/65 (43,1 %) J35	Stricte avant le transfert (cl 1 et 2). Très stricte après décongélation (conservation de 26 % des embryons)
Kajihara et al., 1992	ND	327/866 (37,8 %) (Non mentionné)	Non mentionné
Massip et al., 1993	ND	7/19 (36,8 %) (> 2 mois)	Non mentionné
Van Langendonck, et al., 1993	5/16 (31,3 %) J35	5/17 (29,4 %) J35	Non mentionné
Van Soom et al., 1993	37/90 (41,1 %) J42	2/27 (7,4 %) J42	Non mentionné

ND = non déterminé

J... = moment où le diagnostic de gestation a été effectué.

maturation, la fécondation et la culture in vitro, la congélation et le transfert) reste assez faible, si l'on considère le nombre de gestations par rapport au nombre d'ovocytes mis en maturation.

En conclusion, la production in vitro d'embryons bovins peut aujourd'hui rendre de grands services aux sélectionneurs, notamment lors d'éliminations d'élevages pour raisons sanitaires. Néanmoins, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour produire des embryons capables de supporter la congélation, condition sinon indispensable, du moins très favorable à la diffusion des techniques in vitro comme

moyen de multiplication et de sélection chez les bovins.

SUMMARY

In vitro production of bovine embryos : limits and future researches.

Recent progress in gamete biology and early embryo development was responsible for great evolution of reproduction techniques in farm

animals. Among these techniques, in vitro production of bovine embryos was developed from slaughterhouse ovaries. This method has been used for individual animals. However, large variations in results were observed, due to several factors, including reproductive state and age of the donor.

In spite of this limitation, in vitro production of bovine embryos may be helpful, when slaughtering of valuable cows is recommended, e.g. for brucellosis disease. Researches are purchased in order to increase the number of oocytes obtained per «elite» cow and to improve the ability of in vitro embryos to support freezing.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS C.E., ROWSON L.E.A., HUNTER G.L. and BISHOP C.P., Long distance transport of sheep ova, *Proc. 4th Int. Congr. Anim. Reprod.*, The Hague, 1961, 2, p 381.
- BARNES F.L. and EYESTONE W.H., Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos, *Theriogenology*, 1990, 33, p 141-152.
- BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F. and DRESSEL M.A., Normal development following in vitro fertilization in the cow, *Biol. Reprod.*, 1982, 27, p 147-158.
- CROZET N., La fécondation in vivo et in vitro, dans «*La reproduction chez les mammifères domestiques et chez l'homme*», 1991, p 332-336, Ed. Marketing, Paris.
- ECTORS F.J., DELVAL A., TOUATI K., THONON F., BECKERS J.F. et ECTORS F., Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine : premiers résultats, *Ann. Med. Vet.* 137, p. 427-431, 1993.
- EYESTONE W.H. and FIRST N.L., Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 1989, 85, p 715-720.
- FIGUEIREDO J.R., HULSHOF S.C.J., VAN DEN HURK R., ECTORS F.J., FONTES R.S., NUSGENS B., BEVERS M.M. and BECKERS J.F., Development of a new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries, *Theriogenology* 40, p. 789-799, 1993a.
- FIGUEIREDO J.R., HULSHOF S.C.J., VAN DEN HURK R., NUSGENS B., BEVERS M.M., ECTORS F.J. and BECKERS J.F., Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro, *Theriogenology* (sous presse), 1993b.
- FONTES R., Influence des cellules épithéliales d'oviducte sur le développement d'embryons bovins in vitro, Thèse de doctorat, Université de Liège, 1993.
- GANDOLFI F. and MOOR R.M., Stimulation of early embryonic development, *J. Reprod. Fert.*, 1987, 81, p 23- 28.
- GANDOLFI F., BREVINI T.A.L., MODINA S., PASSONI L. and LAURIA L., Maternal control of early embryonic development, in «*Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*», 1992, p 93-101. Ed. Lauria and Gandolfi, London.
- GODDARD M.J. and PRATT H.P.M., Control events during early cleavage of mouse embryo : an analysis of the «2-cell block», *J. Embryol. exp. Morph.*, 1983, 73, p 111-113.
- HEAPE W., Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother, *Proc. Roy. Soc.*, 1890. 48, p 457.
- HYTTEL P., GREVE P. and CALLESEN H., Ultrastructure of in vivo fertilization in superovulated cattle, *J. Reprod. Fert.*, 1988, 82, p 1-13.
- JIANG J.Y., ZHONG S. and FAN B.Q., Calf born after the transfer of frozen-thawed embryos from follicular oocytes matured, fertilized and developed in vitro, *Theriogenology*, 1991, 35, p 217.
- JOSHI M.S., Growth and differentiation of the cultured secretory cells of the cow oviduct on reconstituted basement membrane, *J. Exp. Zool.*, 1991, 260, p 229-238.
- KAJIHARA Y., KOMETANI N., SHITANAKA N. and SAITO S., Pregnancy rates and births after the direct transfers of frozen-thawed bovine IVF embryos, *Theriogenology*, 1992, 37, p 233.
- LEIBO S.P. and LOSKUTOFF N.M., Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos, *Theriogenology*, 1993, 39, p 81- 94.
- LU K.H., JIANG H.S., WANG W.L. and GORDON I., Pregnancies established in cattle by transfer of fresh and frozen embryos derived from in vitro maturation and fertilization of oocytes and their subsequent culture in vitro, *Theriogenology*, 1990, 33, p 278.
- MASSIP A., MERMILLOD P., WILS C. and DESSY F., Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced in vitro, *J. Reprod. Fert.*, 1993, 97, p 65-69.
- MERMILLOD P., VANSTEENBRUGGE A., WILS C., MASSIP A. and DESSY F., Study of the bovine embryotrophic activity of serum free oviduct conditioned medium, *Theriogenology*, 1993, 39, p 267.
- NIEMANN H., Cryopreservation of ova and embryos from livestock : current status and research needs, *Theriogenology*, 1991, 35, p 109-124.
- NEWCOMB R., CHRISTIE W.B. and ROWSON L.E.A., Birth of calves after in vivo fertilisation of oocytes removed from follicles and matured in vitro, *Vet. Rec.*, 1978, 102, p 461- 462.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J. and FIRST N.L., Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro, *Theriogenology*, 1985, 24, p 537-549.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J.L., HANDROW R.R., SIMS M.M. and FIRST N.L., Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid, *Biol. Reprod.*, 1989, 40, p 1020-1025.
- PIETERSE M.C., VOS P.L.A.M., KRUIP Th.A.M., WURTH Y.A., VAN BENEDEN Th.H., WILLEMSE A.H. and TAVERNE M.A.M., Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes, *Theriogenology*, 1991, 35, p 19-24.

- PIKO L. and TYLER A., Fine structural studies of sperm penetration in the rat. *Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Trento*, 1964, 2, p 372-377.
- POLGE C., Embryo transplantation and preservation, in «*Control of Pig Reproduction*», 1982, p 277-291, Eds D.J.A. Cole and G.R. Foxcroft Butterworths, London.
- RABAH F., MONNIAUX D., PISSELET C. and DURAND P., Control of In Vitro Maturation of Bovine Cumulus-Oocyte Complex by Preovulatory Granulosa Cells, *Mol. Reprod. Dev.*, 1993, 34, p 431-432.
- REICHENBACH H.D., LIEBRICH J., BERG U. and BREM G., Pregnancy rates and births following transfer of in vitro produced IVM-IVF bovine embryos to synchronous or asynchronous recipients. Reports of 6th European Embryo Transfer Meeting, Lyon, September 7-8 1990, p 182.
- REICHENBACH H.D., LIEBRICH J., BERG U. and BREM G., Pregnancy results following transfer of frozen-thawed in vitro produced embryos to recipients, Reports of 7th European Embryo Transfer Meeting, Cambridge, September 14-15 1991, p 198.
- RIEGER D., LOSKUTOFF N.M. and BETTERIDGE K.J., Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and cultured in vitro, *J. Reprod. Fert.*, 1992, 95, p 585-595.
- RORIE R.W., XU K.P. and BETTERIDGE K.J., Effects of culture on the post-thaw viability of cryopreserved, in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 1990, 33, p 311.
- SUZUKI T., TAKAGI M., YAMAMOTO M., SAHA S., BOEDIONO A. and OE M., Pregnancy rate and survival in culture of bovine IVF embryos frozen in various cryoprotectants and thawed in a one step system, *Theriogenology*, 1993, 39, p 324.
- SREENAN J.M., SCANLON P., and GORDON I., Culture of fertilized cattle egg's, *J. Agric. Sci. Camb*, 1968, 70, p 183-185.
- TAKAGI M., SAHA S., BOEDIONO A. and SUZUKI T., Survival rate of frozen-thawed IVF embryos in relation to equilibration time using various cryoprotectants, *Theriogenology*, 1993, 39, p 325.
- THIBAULT C., La culture in vitro de l'oeuf de vache, *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 1966, 6, p 159-164.
- THIBAULT C., GERARD M. et MENEZO Y., Acquisition par l'ovocyte de lapine et de veau du facteur de décondensation du noyau du spermatozoïde fécondant (MPGF), *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 1975, 15, p 705-714.
- THIBAULT C., SZOLLOSI D. and GERARD M., Mammalian oocyte maturation, *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 1987, 27, p 865-896.
- THONON F., ECTORS F.J., DELVAL A., FONTES R.S., TOUATI K. and BECKERS J.F., In vitro maturation, fertilization and development rates of bovine oocytes connected with the reproductive status of the donor, *Theriogenology*, 1993, 39, p 330.
- VAN DER SCHANS A., VAN RENS B.T., VAN DER WESTER-LAKEN L.A. and DE WIT A.A., *Proc. 12th International Congress on Animal Reproduction*, The Hague, 1992, 3, p 1366-1368.
- VAN LANGENDONCKT A., MERMILLOD P., VANSTEENBRUGGE A., GRISART B., WILS C., MASSIP A. and DESSY F., Two Years of culture of bovine embryos in serum-free conditioned medium : results and perspective, Reports of a study day on «In vitro fertilization in the bovine», Gent, 14 mai 1993.
- VAN SOOM A. and DE KRUIF A., A comparative study of in vivo and in vitro derived embryos, *Proc. 12th International Congress on Animal Reproduction*, The Hague, 1992, 3, p 1363-1365.
- VAN SOOM A., VAN VLAENDEREN I., MIJTEN P., VAN DEN BRANDEN J., MAHMOUDZADEH A.R. en DE KRUIF A., De produktie van dikbilkalveren door middel van in vitro fertilisatie-technieken, Tweede Embryotransplantatie studiedag voor Embryotransplantatie-teams in de Benelux, Veldhoven, 1993.
- WASSARMAN P.M., BLEIL J.D., FLORMAN H.M., GREVE J.M., ROLLER R.J., SALZMANN G.S. and SAMUELS F.G., The mouse egg's receptor for sperm : what is it and how does it work ?, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1985, 50, p 11-19.
- WASSARMAN P., La fécondation des oeufs de mammifères, *Pour la science*, 1989, 136, p 52-59.
- WILLADSEN S.M. and POLGE C., Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation, *Vet. Rec.*, 1981, 108, p 211-213.
- WILLETT E.L., BLACK W.G., CASIDA L.E., STONE W.H. and BUCKNER P.J., Successful transplantation of fertilised bovine ovum, *Science*, 1951, 113, p 247.
- WILMUT I. and ROWSON L.E.A., Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos, *Vet. Rec.*, 1973b, 92, p 686-690.
- WOLF D.P. and HAMADA M., Induction of zonal and egg plasma membrane blocks to sperm penetration in mouse eggs with cortical granule exudate, *Biol. Reprod.*, 1977, 17, p 350-354.
- XU K.P., POLLARD J.W., RORIE R.W., PLANTE L., KING W.A. and BETTERIDGE K.J., Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by in vitro maturation, fertilization and co-culture, *Theriogenology*, 1990, 33, p 351.