

## Clonage embryonnaire et sexage chez les bovins : résultats actuels et perspectives

Y. HEYMAN (1), P. CHESNE (1), D. LEBOURHIS (2), J.P. RENARD (1)

(1) INRA, Unité de Biologie du Développement, 78352 Jouy en Josas Cedex, France

(2) UNCEIA, Services techniques, 13 rue Jouet, 94703 Maisons-Alfort, France

**RÉSUMÉ** – L'obtention d'animaux identiques génétiquement devient une réalité chez les bovins. Les progrès récents en maturation in vitro d'ovocytes, transplantation nucléaire et sexage ont permis d'obtenir des clones d'embryons sexés avec un rendement voisin de celui de la fécondation in vitro (30%). La transplantation de tels embryons clonés a abouti à la naissance en France d'une quarantaine de veaux dont 9 clones de 2 à 5 individus utilisés comme modèles pour les recherches en pathologie et nutrition. L'application de cette technologie associant clonage et sexage dans un schéma de sélection est envisagée. Les perspectives d'utilisation de lignées de cellules embryonnaires comme source de noyaux sont discutées.

## Embryo cloning and sexing in bovine : Current results and prospects

Y. HEYMAN (1), P. CHESNE (1), D. LEBOURHIS (2), J.P. RENARD (1)

(1) INRA, Unité de Biologie du Développement, 78352 Jouy en Josas Cedex, France

**ABSTRACT** – The production of genetically identical animals becomes now possible in cattle. Recent progress on in vitro maturation of oocytes, nuclear transfer and embryo sexing resulted in getting clones of sexed blastocysts at a rate which is close to that of in vitro fertilisation (30%). Subsequent transfer of such cloned embryos resulted in the birth of 40 calves in France, including 9 clones of 2 to 5 animals currently used as models for research on pathology and nutrition. The application of this technology associating nuclear transfer and sexing in breeding schemes could be interesting. The future possibilities of establishing bovine embryonic stem cells and using them as a source of nuclei are discussed.

## INTRODUCTION

L'obtention de bovins identiques génétiquement pour les besoins de la recherche était par le passé, limitée au recensement des paires de veaux jumeaux monozygotes ou « vrais jumeaux » nés naturellement dans les élevages. L'INRA avait d'ailleurs déjà mis en place dans les années soixante un service spécialisé pour acheter les jumeaux et jumelles identiques de 3 races: la Normande, la Française Frisonne Pie Noire et la Pie rouge de l'Est afin de développer les recherches sur l'alimentation et la production laitière ou les performances de reproduction (Grosclaude 1962). Or chez les bovins, de tels jumeaux sont excessivement rares puisque le taux de naissances gemellaires varie de 0,6 à 2,5 % selon les races (Ménissier 1965) et seulement une petite partie de ces jumeaux sont monozygotes ou univitellins, la majorité étant les « faux jumeaux » résultat de la fécondation à la suite d'ovulations doubles. Depuis une dizaine d'années il est possible de « fabriquer » de tels jumeaux au patrimoine héréditaire identique grâce à la micromanipulation de l'embryon préimplantatoire. Une morula âgée de 5 jours ou bien un jeune blastocyste de 7 à 8 jours peuvent être scindés en 2 demi-embryons par bisection et les deux moitiés reimplantées dans l'utérus de receveuses synchrones peuvent aboutir à la naissance de jumeaux monozygotes (Ozil et al 1982). Cependant, cette technique connaît des limites puisque par simple section d'un jeune embryon il n'est pas possible d'obtenir des triplés ou quadruplés identiques génétiquement. Une approche nouvelle chez les mammifères mais déjà ancienne chez les amphibiens: le clonage embryonnaire par transfert de noyaux, ouvre des perspectives intéressantes pour produire des clones d'animaux utilisables comme modèles pour l'expérimentation ou bien comme un nouvel outil pour la diffusion et la création de progrès génétique (Colleau 1992).

## 1 - EVOLUTION DE LA MÉTHODE DE TRANSFERT NUCLÉAIRE

### 1-1- PRINCIPE

Le principe du clonage est relativement simple, il consiste à partir d'un embryon « donneur » de noyaux, à le dissocier pour isoler toutes les cellules ou blastomères qui le constituent et ensuite, à greffer une par une chacune de ces cellules (dont les noyaux sont porteurs de la même information génétique) dans toute une série d'ovocytes appelés receveurs et qui auront au préalable été énucléés c'est à dire débarrassés de leur propre ADN. La réalisation fut compliquée à mettre en oeuvre sur l'embryon de mammifère contrairement à l'embryon des vertébrés inférieurs. C'est en Angleterre que pour la première fois chez les mammifères domestiques, un agneau a pu être obtenu par transfert nucléaire (Willadsen 1986). Chez les Bovins les premiers clones de veaux ont vu le jour au début des années 90 au sein de grandes sociétés privées Nord-Américaines (Bondioli et al 1990) moyennant un coût exorbitant en raison du rendement très faible de la méthode (2 à 3% de veaux nés pour 100 noyaux greffés) à ce moment là.

### 1-2- FACTEURS DE PROGRÈS

#### 1-2-1 -La maturation in vitro des ovocytes

Pour cloner une morula de bovin prélevée à 6 jours par les techniques maintenant classiques de collecte d'embryons,

il faut disposer au même moment d'un grand nombre d'ovocytes au stade de la métaphase II. Initialement ces ovocytes étaient produits in vivo par superovulation de vaches qui devaient être abattues dans les quelques heures qui suivent l'ovulation et dont on perfusait les oviductes. Récemment les progrès réalisés au niveau des recherches sur la maturation et la fécondation in vitro chez les bovins (voir Mermillot et al. 1995) permettent maintenant de produire entièrement in vitro ces ovocytes receveurs en grand nombre et à un coût très réduit pour le clonage (Barnes et al 1993). Pour cela des ovaires de vache sont récupérés à l'abattoir, transportés au laboratoire où les follicules à antrum de 3 à 8 mm de diamètre sont ponctionnés et les complexes cumulus-ovocytes (au stade vesicule germinative) sont cultivés in vitro à 39°C sur des monocouches de cellules de granulosa dans un milieu M199 supplémenté en FSH, LH et estradiol 17  $\beta$ , pendant 24 h. Après cette période, plus de 90% des ovocytes ont atteint le stade métaphase II et peuvent être utilisés en grand nombre pour préparer des cytoplasmes receveurs.

#### 1-2-2- Une énucléation et une activation efficaces

Nous avons développé au laboratoire sur le modèle lapin, une méthode originale pour contrôler directement sous le microscope de micromanipulation le retrait de tous les chromosomes ovocytaires (Heyman et al 1990). Cette méthode est appliquée à l'ovocyte de bovin qui est incubé en présence de cytochalasine pour dépolymériser le cytosquelette de la cellule et d'un marqueur spécifique de l'ADN (Bisbenzimidazole Hoechst 33342, 0,5  $\mu$ g/ml). Lors de la micromanipulation, les chromosomes de la plaque métaphasique sont visualisés en microscopie de fluorescence à bas niveau de lumière après une amplification du signal émis dans l'UV. Ainsi nous pouvons vérifier l'aspiration des chromosomes directement dans la pipette de micromanipulation et être sûrs à 100% de l'énucléation des ovocytes receveurs sans altérer leur compétence au développement.

De plus, au moment de sa reconstitution par fusion avec un blastomère, le cytoplasme receveur doit être activé or il est connu que l'ovocyte de bovin est particulièrement difficile à activer en l'absence de fécondation (Ware et al 1989). Nous avons mis au point un traitement particulier des ovocytes produits par maturation in vitro, qui associe l'énucléation à une période de « vieillissement » de 12 h suivie d'un refroidissement à + 10°C avant d'introduire le noyau (Chesné et al. 1993). Un tel traitement permet d'amener les cytoplasmes receveurs en tout début d'interphase avec une activité MPF (Maturation Promoting Factor) fortement diminuée (Gall et al. 1995). Il est également possible de pré-activer les ovocytes par des stimulations électriques répétées ou un traitement chimique (Presicce et Yang 1994). L'état du cytoplasme receveur au moment de la fusion avec le noyau exogène est déterminant pour le remodelage de la chromatine du noyau transplanté et la faible activité MPF est favorable au développement des embryons reconstitués car elle permet de limiter les risques liés à la condensation prématurée de la chromatine (Campbell et al 1994).

#### 1-2-3- Une bonne méthode de culture in vitro pour l'embryon cloné

Le zygote de ruminant et spécialement de bovin est particulièrement difficile à cultiver in vitro jusqu'au stade blastocyste; il se bloque en général au stade 8-16 cellules cor-

respondant à la mise en route du génome embryonnaire. Ce blocage, qui n'existe pas in vivo dans l'oviducte, peut être partiellement levé in vitro en utilisant des systèmes de coculture avec différents types de cellules (Heyman et al. 1987, Goto et al. 1988, Eyestone et al. 1987). La plupart des auteurs utilisent des monocouches de cellules d'oviducte de vache comme support au développement in vitro des zygotes de bovins produits par FIV ou clonage et ont abandonné la culture temporaire «in vivo» dans l'oviducte d'un animal-hôte intermédiaire comme la brebis ou la lapine. Cependant la culture primaire de cellules épithéliales d'oviductes comme support au développement in vitro des zygotes de bovins reste un système de coculture relativement variable selon les préparations. Nous utilisons maintenant avec succès un lignée bien établie de cellules épithéliales de rein de singe (VERO) qui se congèle parfaitement bien et qui permet d'obtenir en coculture des taux de blastocystes de l'ordre de 30% dans des conditions standardisées, peu variables et parfaitement sûres sur le plan sanitaire puisque cette lignée est indemne de toute contamination virale (Menck et al. 1994).

## 2- RÉSULTATS ACTUELS DU CLONAGE

### 2-1- DÉVELOPPEMENT IN VITRO DES OEUFS RECONSTITUÉS

Dans l'état actuel des techniques utilisées pour le transfert nucléaire à partir d'embryons frais âgés de 5 à 6 jours et de cytoplasmes préparés à partir d'ovocytes maturés in vitro, on peut considérer qu'en moyenne 75% des oeufs reconstitués par électrofusion sont capables de reprendre leur segmentation. Après 7 jours de coculture, 30 % atteignent le stade blastocyste compatible avec la remise en place in utero dans une femelle porteuse. Dans nos conditions (tableau 1), cette aptitude au développement des oeufs issus de greffe nucléaire est du même ordre que celle des embryons témoins obtenus par fécondation in vitro (33%; Heyman et al 1994). Il faut toutefois signaler que l'utili-

sation d'embryons préalablement congelés comme source de noyaux pour le clonage ne permet pas encore d'obtenir des taux de blastocystes satisfaisants, puisque ce taux ne dépasse pas 7%. Ceci est une contrainte sur le plan pratique car il faut disposer au moment du clonage de morulae fraîchement récoltées sur la vache d'élite sélectionnée comme donneuse d'embryons. Une solution alternative temporaire consiste à refroidir les embryons donneurs à une température de 10-15°C ce qui permet de les conserver pendant 24 h sans diminution de viabilité et donc de transporter et cloner des embryons prélevés sur des vaches d'élite dans des élevages relativement éloignés du laboratoire (Lebourhis et al. 1995).

Il faut noter également qu'il existe une grande variabilité dans le nombre de blastocystes clonés obtenus in vitro selon les embryons donneurs utilisés ; en effet, si un tiers des morulae ne produisent pas plus de 2 blastocystes / donneur après transfert nucléaire, 10% des embryons donneurs sont capables de produire chacun au moins une dizaine de blastocystes (Chesné et al 1993).

Enfin, les blastocystes de bovin développés in vitro après transfert nucléaire ont les mêmes caractéristiques morphologiques que des embryons issus de FIV. Ils sont constitués d'un nombre semblable de cellules à l'âge de 7 jours ( $82,86 \pm 5,35$  vs  $88,89 \pm 7,53$  cellules par embryon pour les clones et les FIV respectivement). Il faut avoir recours à l'ultrastructure pour déceler éventuellement quelques signes de dégénérescence dans les cellules de la masse cellulaire interne, susceptibles d'expliquer la plus faible viabilité ultérieure des embryons clonés.

### 2-2- TRANSPLANTATIONS D'EMBRYONS CLONÉS

Les blastocystes clonés développés in vitro peuvent être transplantés directement dans l'utérus de receveuses dont le cycle est synchronisé (J 7) avec l'âge de l'embryon. Il est possible de transplanter 2 embryons clonés dans la même receveuse car ils sont obligatoirement de même sexe,

**Tableau 1**  
Développement in vitro des embryons clonés selon la source de noyaux utilisée : comparaison avec le développement d'embryons témoins issus de FIV.

Embryon donneur	Oeufs reconstitués n	Fusion n (%)	Clivage n (%)	Blastocystes n (%)
In vivo Frais	621	497/621 (80,0)	375/497 (75,4)	150/497 (30,2) <sup>a,b</sup>
In vitro	214	181/214 (84,5)	128/181 (70,7)	41/181 (22,6) <sup>b</sup>
In vivo Refroidi	236	189/236 (80,0)	142/189 (75,1)	48/189 (25,4) <sup>b</sup>
In vivo Congelé	208	154/208 (74,0)	100/154 (64,9)	11/154 (7,1) <sup>c</sup>
Témoin FIV	inséminés 704	fécondés 657/704	clivés 589/657	blastocystes 222/657 (33,8) <sup>a</sup>

Test X2 par colonne, les pourcentages avec des exposants différents, diffèrent significativement. a,c P<0,005 ; a,b P<0,05.

**Tableau 2**  
Evolution des taux de gestation après transplantation de blastocystes issus de clonage.

Embryon donneur	Oeufs reconstitués n	Fusion n (%)	Clivage n (%)	Blastocystes n (%)
In vivo Frais	621	497/621 (80,0)	375/497 (75,4)	150/497 (30,2) <sup>a,b</sup>
In vitro	214	181/214 (84,5)	128/181 (70,7)	41/181 (22,6) <sup>b</sup>
In vivo Refroidi	236	189/236 (80,0)	142/189 (75,1)	48/189 (25,4) <sup>b</sup>
In vivo Congelé	208	154/208 (74,0)	100/154 (64,9)	11/154 (7,1) <sup>c</sup>
Témoin FIV	inséminés 704	fécondés 657/704	clivés 589/657	blastocystes 222/657 (33,8) <sup>a</sup>

et donc sans risque d'induire le free-martinisme. Dans une étude de suivi de gestation portant sur 104 receveuses (Tableau 2) nous avons montré que le taux de gestations initié, estimé par le dosage de la progestérone plasmatique à J 21 (DG) est de l'ordre de 60% donc proche de celui obtenu en transplantation embryonnaire «classique». Cependant, les contrôles échographiques répétés et le dosage régulier de la protéine de gestation PSP 60 révèlent l'existence de mortalités embryonnaires et foetales importantes puisque le taux de vélages à terme n'est plus que de 25,9 % et correspond aux chiffres annoncés par de grandes compagnies nord-américaines (20 % Selon Bondioli 1993). Au cours des 2 dernières années nous avons fait naître en France une quarantaine de veaux issus de transfert nucléaire dont 9 clones de 2 à 5 individus. Ces clones sont utilisés comme modèles expérimentaux pour des recherches en nutrition et en pathologie. Tous ces veaux étaient normalement constitués et avaient un poids moyen de 39,09 ± 3,59 Kg à la naissance pour le genotype Holstein. Plusieurs équipes ont rapporté la naissance de veaux anormalement gros après transplantation d'embryons cloné ou issus de fécondation in vitro (Bondioli 1993). Il semblerait que ce syndrome du «gros veau» soit lié aux conditions de la culture in vitro du zygote pendant plusieurs jours et non pas au transfert

nucléaire proprement dit. Une étude basée sur une enquête à l'échelon international est en cours de réalisation pour essayer d'évaluer ce risque.

### 3) SEXAGE ET CLONAGE

Selon l'objectif retenu pour l'utilisation ultérieure des clones de bovins (schéma de sélection, modèles animaux pour la recherche...) il est très important de pouvoir produire au choix soit un clone de mâles, soit un clone de femelles. Nous avons associé ces 2 technologies : transfert nucléaire et détermination du sexe dans le but de produire des clones mâles. Pour le sexage nous avons utilisé la méthode française (INRA-Rhone Mérieux-Unceia) basée sur la recherche d'une séquence spécifique du chromosome Y après amplification par PCR de l'ADN extrait de quelques cellules et révélation par électrophorèse sur gel d'agarose après coloration au bromure d'éthidium. Une étude préliminaire avait pour but de déterminer le nombre minimal de cellules embryonnaires nécessaires pour le sexage. Elle a permis de montrer que la quantité d'ADN extraite d'une seule cellule isolée après dissociation de l'embryon donneur de noyaux était suffisante pour connaître le sexe de cet embryon donneur (Tableau 3, Heyman et al. 1994.). Lors

**Tableau 3**  
Efficacité de la détermination du sexe de l'embryon donneur selon le nombre de cellules prélevées.

nb de cellules prélevées	nb embryons utilisés	nb embryons sexés	efficacité
1	10	9/10	90%
2	17	15/17	88%
3	12	10/12	83%
> 5	12	11/12	92%
total	51	45/51	88%

**Tableau 4**  
**Résultat des transplantations de blastocystes clonés issus de 5 embryons mâles.**

série de transfert	nb embryons	nb receveuses	nb gestations	nb vélages	veaux nés vivants
1	3	3	1/3	1/3	1 mâle
2	4	4	0/4	0/4	-
3	13	7	4/7*	3/7	4 mâles
4	7	4	3/4	3/4	4 mâles
5	3	2	1/2	0/2	-
total 5 séries	30	20	9/20 (45%)	7/20 (35%)	9/30 (30%)

\* 1 avortement à 5 mois de gestation = 2 fœtus mâles.

d'une opération de clonage, pour chaque morula donneuse utilisée, un blastomère est réservé pour l'identification du sexe et tous les autres sont fusionnés avec autant de cytoplasmes receveurs avant d'être cultivés in vitro. Dès que le résultat du sexage est connu, on peut alors décider de ne transplanter que les clones de blastocystes développés in vitro et issus d'embryons mâles (Tableau 4) ; ainsi nous avons pu faire naître en 1994 deux premiers clones de 4 veaux mâles issus d'embryons préalablement sexés.

Cette approche présente un double intérêt : d'une part, elle ne nécessite pas de biopsie supplémentaire car on profite de la dissociation de l'embryon donneur pour prélever une seule cellule, d'autre part la période de culture in vitro de l'embryon reconstitué pendant 7 jours, laisse largement le temps d'effectuer le diagnostic du sexe (qui dure quelques heures) avant la transplantation proprement dite.

A l'avenir, dans le cadre du clonage, le diagnostic réalisé à partir d'une seule cellule embryonnaire ne devrait pas se limiter au sexage. On peut envisager de repérer un certain nombre d'anomalies telles que le BLAD et éliminer ainsi des embryons porteurs pour ne cloner que les embryons sains dont le génotype est caractérisé.

#### 4- LES NOUVELLES SOURCES DE NOYAUX

##### 4-1 LE RECLONAGE

Le nombre de noyaux totipotents dans une morula est limité et ne permet pas d'obtenir des clones de grande taille en une seule génération de transfert nucléaire (la totipotence nucléaire définit l'aptitude d'un noyau à générer un individu entier après transfert dans un cytoplasme receveur). Chez les amphibiens, le recyclage d'embryons clonés comme source de noyaux pour la greffe en plusieurs générations est possible (Orr et al 1986). Chez les mammifères domestiques et en particulier chez les bovins il avait été montré que des morulae issues de transfert nucléaire pouvaient être utilisées comme donneurs de noyaux en deuxième génération de clonage (Bondioli et al. 1990). Cependant, une étude réalisée par une autre équipe américaine (Stice et Keefer, 1993) a montré que si le développement in vitro des oeufs reconstitués se maintient jusqu'à la 3ème génération, la viabilité des blastocystes obtenus diminue fortement puisque les taux de vélages après transplantation

d'embryons de issus de 3ème génération de transfert nucléaire ne dépasse pas 3%. Tout récemment une équipe belge (Ectors 1995) a produit des veaux de race blanc-bleu en clonage de 2ème génération sans diminution de rendement puisque le taux de développement à terme était de 20% (5 veaux nés à partir de 24 blastocystes de 2ème génération). Bien que les effectifs soient encore limités, ce dernier résultat est tout à fait encourageant car il offre réellement la possibilité de démultiplier un embryon par un deuxième cycle de clonage

##### 4-2- LES CELLULES EMBRYONNAIRE-SOUCHES (ES)

La totipotence de noyaux de la masse cellulaire interne d'un embryon au stade blastocyste a été démontrée par transfert nucléaire chez la brebis (Smith et Wilmut 1989) et la vache (Keefer et al. 1994). La possibilité d'établir en culture une lignée de cellules indifférenciées à partir d'un bouton embryonnaire de blastocyste de bovins offrirait alors une source de noyaux virtuellement illimitée pour le clonage. De nombreuses lignées de cellules ES existent déjà chez la souris (Robertson 1987). Cependant à ce jour, il n'y a pas encore véritablement de lignées de cellules ES pour les mammifères domestiques malgré des recherches très actives sur l'embryon de porc, de brebis ou de vache, mais les espoirs sont réels (voir revue par Galli et al 1994). Chez la brebis des boutons embryonnaires de blastocystes ont été isolés par immunochirurgie et cultivés in vitro pendant 6 passages. Des cellules prélevées au 3ème passage et greffées dans des ovocytes énucléés ont abouti à la naissance de 2 jeunes agneaux (Campbell et al. 1995). Chez les bovins, des noyaux de cellules d'une lignée « présumée ES » ont pu être reprogrammés jusqu'au stade blastocyste après transfert nucléaire et réimplantés in utero mais le développement foetal s'arrête vers 50 jours de gestation. (Stice et al. 1994).

##### 4-3 LES CELLULES GERMINALES

Les cellules germinales primordiales qui continuent de se multiplier dans les gonades foetales pourraient constituer également une source de noyaux identiques en grand nombre pour la production de clones. Il a été montré que des noyaux de gonies prélevés dans des foetus mâles de lapin peuvent être reprogrammés par transfert nucléaire et se développer

jusqu'au stade blastocyste (Moens et al 1995). Des essais sont réalisés chez les bovins et la greffe de gonies isolés de foetus de veaux de 48 jours, dans des cytoplasmes receveurs a permis d'obtenir quelques blastocystes (2 à 3%) mais la transplantation de tels blastocystes issus de cellules germinales n'a pas abouti à une gestation (Moens et al non publié) et la totipotence d'une telle source de noyaux reste à démontrer.

## CONCLUSIONS

Même si les rendements du clonage embryonnaire bovin sont encore faibles, des progrès substantiels ont été réalisés ces dernières années à la fois sur le plan technique (maturation, culture in vitro, micromanipulations) et sur le plan plus fondamental de la compréhension des échanges noyau/cytoplasme. Dans la situation actuelle, on peut d'ores et déjà envisager d'intégrer l'utilisation de cette technolo-

gie dans un schéma de sélection. Les travaux de Colleau (1993) soulignent l'intérêt du clonage et du sexage pour le progrès génétique en race laitière, l'utilisation de clones permettra de connaître avec la même précision, mais avec un nombre d'animaux beaucoup plus réduit, les caractéristiques d'un reproducteur. Le coût de la sélection en sera d'autant moins élevé, ce qui permettra alors de développer des programmes sur des critères moins héréditaires que les critères quantitatifs généralement utilisés aujourd'hui.

De même pour la recherche, des clones de bovins peuvent être produits en nombre limité pour être utilisés comme modèles animaux dans de nombreuses disciplines telles que la pathologie, la nutrition ou la reproduction. Ces clones peuvent contribuer à réduire à la fois la variabilité de réponse entre individus lors d'une expérimentation et le nombre d'animaux nécessaires pour une étude généralement onéreuse dès qu'il s'agit de grands ruminants comme les bovins.

## RÉFÉRENCES

- BARNES F., ENDEBROCK M., LOONEY C., POWELL R. WESTHUSIN M., BONDIOLI K. 1993. *J. Reprod. fert.* 97:317-320
- BONDIOLI K., WESTHUSIN M., LOONEY C., 1990. *Theriogenology* 33: 165-173
- BONDIOLI K., 1993. In « Symposium on Recent Developments in Embryo Biotechnology for Farm Animals, Baton-Rouge. USA pp 21-22
- CAMPBELL K, LOIL L., CAPPAL P. WILMUT I, 1994 *Biol. Reprod.*
- CAMPBELL K., MC WHIR J., RITCHIE B., WILMUT I., 1995. *Theriogenology* 43: 181
- CHESNÉ P., HEYMAN Y., PEYNOT N., RENARD J.P., 1993 *C.R. Acad. Sci. Paris* 316:487-491
- COLLEAU J.J., 1992. *Genet. Sel. Evol.*, 24: 345-361
- COLLEAU J.J., 1993. *Cahiers d'Agriculture* 2: 93-102
- ECTORS F. 1995. Thèse : le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine. Université libre de Bruxelles
- EYESTONE W., FIRST N., 1989. *J. Reprod. Fert.* 85: 715-720
- GALL L, DEDIEU T., PEYNOT N., CHESNÉ P., SEVELLEC C., RUFFINI S., RENARD J.P., HEYMAN Y., 1995. *Biol. Reprod.* (soumis).
- GALLI C., LAZZARI G., FLECHON J.E., MOOR R., 1994. *Zygote* 2: 385-389
- GOTO K., KAJIHARA Y., KOSAKA S., KOBAYASHI M., NAHANISHI Y., OGAWA K., 1988. *J. Reprod. Fert.* 83: 753-758.
- GROSCLAUDE F., 1962. *La revue de l'Elevage*, décembre 1178-1188
- HEYMAN Y, MÉNÉZO Y., CHESNÉ P., CAMOUS S. GARNIER V, 1987. *Theriogenology* 27: 59-68
- HEYMAN Y., CHESNÉ P., RENARD J.P., 1990. *C.R. Acad. Sci. Paris ser III*311:321-326
- HEYMAN Y., CHESNÉ P., LEBOURHIS D., PEYNOT N. RENARD J.P. 1994. *Theriogenology* 42: 695-702
- HEYMAN Y., CHESNÉ P., THUARD J.M., LEBOURHIS D., MARCHAL J, NIBART M., 1994. *Proc. 10th A.E.T.E. meeting*, pp 180.
- KEEFER C., STICE S, MATTHEWS D., 1994. *Biol. Reprod.* 50: 935-939.
- LEBOURHIS D., HEYMAN Y., DENIAU F., RENARD J.P., 1995. 11th AETE meeting
- MENCK C., LEBOURHIS D., HEYMAN Y, PEYNOT N., RENARD J.P., 1994. *Proc. 10th AETE meeting* pp 220.
- MENISSIER F, 1965. Rapport sur l'analyse du taux de naissances géminaires dans la zone du CIA de Naves, CNRZ. Jouy en Josas
- MERMILLOD P., CROZET N., COGNIE Y., 1995. *Renc. Rech. Ruminants*, 2 : in press.
- MOENS A. , CHASTANT S., CHESNÉ P. , BETTERIDGE K. RENARD J.P., 1995 . *Theriogenology* 43:283
- OZIL J.P., HEYMAN Y., RENARD J.P. , 1982. *The Vet. Rec.*110: 126-127
- PRESICCE G., YANG X , 1994. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 380385
- ROBERTSON E. 1987. In Robertson (Editor), *Teratocarcinomas and embryonic stem cells*, IRL press Oxford 71-112.
- SMITH L., WILMUT I , 1989. *Biol. Reprod.* 40: 1027-1035
- STICE S., KEEFER C., 1993. *Biol. Reprod.* 48: 715-719.
- STICE S., STRELCHENKO N., BETTHAUSER J., SCOTT B., JURGELLA G., JACKSON J., DAVID V., KEEFER C., MATTHEWS L., 1994. *Theriogenology* 41: 301.
- WARE C., BARNES F., MAKI-LAURILA M., FIRST N.L., 1989. *Gamete Res.* 22:265-275
- WILLADSEN S., 1986 . *Nature* 320: 63-65.