

Production in vitro d'embryons bovins, ovins et caprins : le point et les perspectives

P. MERMILLOD (1), N. CROZET (2), Y. COGNIE (1)

(1) INRA, Station de Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques, 37380 Nouzilly

(2) INRA, Physiologie Animale, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex

RÉSUMÉ – La production d'embryons in vitro (PIV) comporte trois étapes : la maturation in vitro (MIV), la fécondation in vitro (FIV) et le développement in vitro (DIV) qui permettent d'obtenir, à partir d'ovocytes immatures, des embryons au stade de morula ou blastocyste, transférables dans l'utérus de femelles receveuses. L'étape de FIV est assez bien maîtrisée dans les trois espèces bovine, ovine et caprine. Des améliorations importantes ont été apportées aux étapes de MIV et DIV mais seulement 30% des ovocytes traités atteignent le stade de blastocyste et ces blastocystes montrent une viabilité plus faible que celle d'embryons obtenus in vivo. Les progrès réalisés dans la classification des ovocytes en fonction de leur capacité à produire des embryons et dans le développement de systèmes définis, sans soutien cellulaire ou additifs complexes pour les étapes de MIV et de DIV sont présentés. Les axes de recherche traités en vue d'améliorer les rendements quantitatifs et qualitatifs de ces techniques sont discutés.

In vitro production of cattle, sheep and goat embryos : state of the art and prospects

P. MERMILLOD (1), N. CROZET (2), Y. COGNIE (1)

(1) INRA, Station de Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques, 37380 Nouzilly

SUMMARY – In vitro production of embryos involves three steps : in vitro maturation (IVM), fertilization (IVF) and development (IVD) yielding morula-blastocyst stage transferable embryos from immature oocytes. The IVF step works quite well in the bovine, ovine and caprine species. Substantial progress has been made in IVM and IVD. However, only 30% of the oocytes reach the blastocyst stage and those blastocysts are still less viable than their in vivo counterparts. Here we describe some new insights in the classification of oocytes according to their ability to develop normally in vitro and the use of defined culture systems for IVM and IVD without somatic cell support nor complex medium supplementation. Research axes to improve qualitative and quantitative yields of those techniques will also be stressed in this review.

INTRODUCTION

Depuis le premier veau issu de fécondation in vitro né aux Etats Unis en 1981 (Brackett et al, 1982), cette technique a été étendue à d'autres espèces (ovins : Crozet et al, 1987; caprins : De Smedt et al, 1992) et a connu d'immenses progrès, la rendant maintenant en passe de sortir des laboratoires pour connaître les utilisations de terrain qu'on peut lui prédire. En effet, les retombées envisageables de la reproduction in vitro des mammifères domestiques sont multiples et intéressent tant l'application que la compréhension plus fondamentale de la maturation finale des gamètes, de la fécondation et du développement embryonnaire précoce. De plus, les techniques in vitro ouvrent la possibilité de mise au point de nouvelles technologies comme le clonage et la transgénèse. Nous n'entrerons pas ici dans les détails des applications possibles de la fécondation in vitro, celles-ci ont déjà été largement décrites par d'autres (Gordon, 1991 ; Hasler, 1994) et certaines applications seront évoquées ici même par d'autres auteurs.

Généralement, on désigne par "fécondation in vitro" (FIV) la production d'embryons transférables par des techniques in vitro. En pratique, on peut considérer trois étapes distinctes à cette production in vitro (PIV) : la maturation in vitro (MIV), la fécondation in vitro proprement dite (FIV) et le développement in vitro (DIV) des zygotes jusqu'au stade voulu pour le transfert à une femelle receveuse (figure 1).

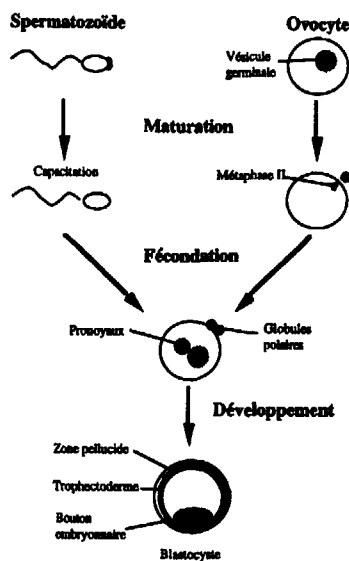


Figure 1 : Schéma de la production d'embryons in vitro (PIV). Les ovocytes subissent une maturation in vitro de 24h avant d'être mis en contact avec les spermatozoïdes. Ces derniers doivent également subir une étape de capacitation avant la fécondation proprement dite. Après la fécondation (18-24h), les zygotes sont mis en développement pour une période de 6 à 8 jours avant d'atteindre le stade de blastocyste auquel ils peuvent être congelés ou transférés à une femelle receveuse synchrone. Les étapes de maturation et de développement restent les points limitants de la technique, tant du point de vue quantitatif que qualitatif.

Ces trois étapes ont fait l'objet de nombreux travaux et ont été considérablement améliorées au cours des dernières années. Cependant, en moyenne, seulement 30 % des ovocytes traités atteindront le stade d'embryon transférable et ces embryons présentent une viabilité moindre que celle observée pour des embryons collectés in vivo au même stade (Hasler et al, 1995). Nous essaierons donc de délimiter

le travail restant à faire pour améliorer ces performances quantitatives et qualitatives. Si l'étape de FIV semble au point dans les trois espèces traitées, les étapes de MIV et DIV sont encore perfectibles et continuent donc d'être l'objet de travaux intenses. C'est sur ces deux dernières que nous insisterons. L'aspect sanitaire de la PIV ne sera pas abordé ici, cependant il peut constituer un problème majeur en cas d'utilisation commerciale de la technique (Thibier et Guérin, 1991).

1. MATURATION IN VITRO (MIV)

1.1. SITUATION DU PROBLÈME

Au sein du follicule ovarien en croissance, l'ovocyte est bloqué au stade de prophase de la première division méiotique. Pendant cette période, il accumule dans son cytoplasme des ARNm sous forme stable et des protéines. La décharge ovulante d'hormones gonadotropes provoque la reprise de la méiose et sa progression jusqu'en métaphase II, s'accompagnant de l'arrêt des transcriptions. La maturation désigne l'ensemble de ces événements précédant l'ovulation. Du point de vue cytoplasmique, les modifications sont peu connues mais on suspecte que l'ovocyte emmagasine des transcrits et des protéines qui seront importants pour sa fécondation et son développement embryonnaire précoce. En effet, la remise en route des transcriptions chez l'embryon n'a lieu qu'après plusieurs clivages (stade 8 cellules).

Il a été observé depuis longtemps que l'ovocyte de follicule antral placé en culture, reprend spontanément sa méiose, sans stimulation gonadotrope. Celle-ci agirait in vivo en levant un signal inhibiteur adressé en permanence à l'ovocyte par les cellules du follicule. Cette reprise spontanée s'observe déjà pour des ovocytes extraits de petits follicules (à partir de 0,5mm chez les caprins, De Smedt et al, 1994) donc plusieurs jours avant l'ovulation (Driancourt, 1991). En production d'embryons in vitro, les ovocytes utilisés proviennent généralement de follicules à antrum de différentes tailles (3 à 6mm). Quelques heures après leur mise en culture, leurs chromosomes se condensent, ils cessent leurs transcriptions et ils reprennent leur méiose. Il aura donc manqué plusieurs jours à certains d'entre eux (provenant des plus petits follicules) pour préparer leur cytoplasme à supporter la longue période de silence génétique à laquelle ils vont être confrontés. C'est peut-être là un des points pouvant expliquer les faiblesses quantitatives et qualitatives des techniques de PIV.

1.2. TECHNIQUES

Les ovocytes immatures sont collectés par ponction de petits follicules (3-6mm), ils sont sélectionnés à la loupe et seuls les ovocytes entourés de plusieurs couches complètes de cellules du cumulus oophorus à l'aspect compact sont conservés. Les complexes cumulus-ovocytes (CCO) sont lavés dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) puis déposés dans le milieu de maturation où ils sont incubés pendant 24 heures dans une atmosphère humide à 39°C contenant 5 % de CO₂ (Mermillod et al, 1992a). Le seul signe morphologique visible, reflétant la maturation ovocytaire, est l'expansion des cellules du cumulus, suite à la sécrétion d'acide hyaluronique dans les espaces intercellulaires. En effet, les inclusions lipidiques contenues

Tableau 1 : Effet du facteur de croissance épidermique murin purifié (EGF), ajouté au milieu de maturation d'ovocytes bovins à 1, 10 ou 100ng/ml sur leur compétence au développement après 8 jours de culture.

Traitement	Ovocytes	Clivés (%)	Blastocystes (%)	Blast/Clivés (%)
M199	247	64 ^a	21 ^a	34 ^a
M199 +EGF 1	342	81 ^b	31 ^b	39 ^{ab}
M199 +EGF 10	349	80 ^b	31 ^b	39 ^{ab}
M199 +EGF 100	317	80 ^b	32 ^b	40 ^{ab}
M199 +FCS	290	72 ^{ab}	32 ^b	45 ^b

Total de 5 répliques. ^{ab}, valeurs différant significativement ($p < 0,05$; Chi-carré)

dans le cytoplasme des ovocytes de nos animaux de ferme, rend impossible le suivi visuel de l'évolution du noyau.

1.3. AMÉLIORATIONS RÉCENTES

1.3.1. Milieu de maturation

Le milieu de culture généralement utilisé pour la maturation des ovocytes est un milieu "classique" (M199, B2), souvent additionné d'hormones gonadotropes (FSH et LH), de stéroïdes (œstradiol), de sérum (sérum de femelle en œstrus ou de veau fœtal), de fluide folliculaire ou de cellules de granulosa (ovins et caprins). Nous avons testé séparément l'effet de ces additifs dans l'espèce bovine (Lonergan et al, 1994a). Les meilleurs résultats sont obtenus avec le milieu additionné de sérum seul (M199+FCS). Le milieu de base (M199) permet à lui seul un taux de développement non négligeable (Tableau 1). L'expansion des cellules du cumulus n'ayant pas lieu dans ce milieu, celle-ci ne semble pas strictement corrélée à la maturation ovocytaire ni à l'acquisition de la compétence au développement. Le mélange hormonal utilisé lors de la maturation diminue la compétence des ovocytes traités mais le sérum contrebalance cet effet (non représenté). Des doses croissantes de p-FSH (10-1000ng/ml) et de p-LH (50-5000ng/ml) ont été testées séparément sans résultats positifs sur la qualité de la maturation (Lonergan et al, 1994a). Il s'avère donc que le FCS contient des facteurs agissant sur la compétence des ovocytes lors de leur maturation, un effet équivalent à d'ailleurs été retrouvé dans le fluide folliculaire (Carolan et al, 1995a).

Des facteurs de croissance pourraient être impliqués dans cet effet positif du sérum et du fluide folliculaire. Les facteurs de la famille de l'insuline (insuline, insulin-like growth factor I et II : IGF-I et IGF-II) pourraient jouer un rôle dans la régulation intra-ovarienne de la folliculogénèse et donc dans la maturation ovocytaire. Ils ont été testés in vitro à différentes concentrations sans succès (Carolan et al, 1995b). D'un autre côté, l'EGF (epidermal growth factor ou facteur de croissance épidermique) a montré un effet similaire à celui du sérum (Lonergan et al, 1995, Tableau 1), dès la concentration minimale testée (1ng/ml).

Des études similaires ont été menées parallèlement chez les ovins (tableau 2), la FSH (o-FSH, 100ng/ml) et l'EGF (100ng/ml) améliorent le taux de développement par rapport au milieu seul mais à un niveau moindre que le fluide folliculaire (FF, 10 %).

Il s'avère donc que, nous disposons maintenant d'un milieu synthétique contenant une protéine murine (EGF) donnant des résultats de maturation comparables à ceux obtenus avec des milieux complexes contenant du sérum. En plus d'avantages sanitaires évidents, ce milieu offrira la possibilité d'étudier plus finement les communications moléculaires entre les cellules somatiques du follicule en fin de croissance et l'ovocyte en reconstituant et en analysant des systèmes de co-culture complexes (CCO + cellules de granulosa et/ou de thèque) en milieu défini et d'en tirer parti pour améliorer encore la compétence des ovocytes après maturation.

Tableau 2 : Effet de la o-FSH (100ng/ml), de l'EGF 100ng/ml et du fluide folliculaire (10%) sur la compétence au développement d'ovocytes ovins après une culture de 7 jours.

Traitement	Ovocytes	Clivés (%)	Blastocystes (%)	Blast/Clivés (%)
M199	170	39 ^a	8 ^a	19 ^a
M199+FSH	176	65 ^b	15 ^b	24 ^a
M199+EGF	176	60 ^b	15 ^b	25 ^a
M199+EGF+FSH	178	68 ^b	17 ^b	25 ^a
M199 +FF	186	81 ^c	28 ^c	25 ^b

Total de 6 répliques. ^{abc}, valeurs différant significativement ($p < 0,05$; Chi-carré)

1.3.2. Source et sélection des ovocytes

Des résultats récents, tant chez les bovins (Lonergan et al, 1994b) que chez les caprins (Crozet et al, 1995), montrent que la compétence au développement des ovocytes s'acquiert progressivement au cours de la croissance folliculaire finale. La figure 2 synthétise ces résultats. On constate que dans les deux espèces, les ovocytes des plus gros follicules donnent les meilleurs résultats en termes de développement jusqu'au stade de blastocyste. Ceci confirme l'importance des derniers stades de la croissance folliculaire pour l'acquisition par l'ovocyte de sa compétence au développement. Toutefois, chez les caprins, les résultats obtenus à partir d'ovocytes de gros follicules restent inférieurs à ceux obtenus avec des œufs ovulés (48 %, non testé chez les bovins). Ceci suggère des conditions encore imparfaites de maturation *in vitro*.

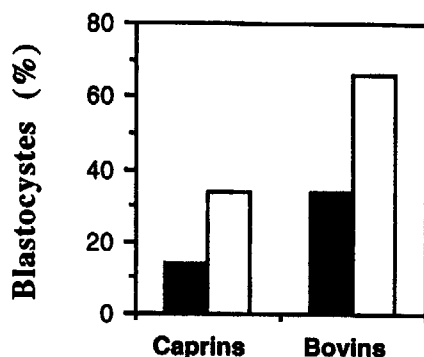


Figure 2 : Taux de développement observés pour des ovocytes provenant de follicules de tailles différentes. Barres pleines : petits follicules (caprins : 3-5mm ; bovins : 2-6mm). Barres vides : gros follicules (caprins : >5mm ; bovins : >6mm). D'après Crozet et al (1995) ; Lonergan et al (1994b).

D'autres caractéristiques du follicule ont également été étudiées. Il semble que les ovocytes les plus compétents pour le développement proviennent de follicules connaissant les premiers signes d'atrésie (Blondin et Sirard, 1995 ; Hazeleger et al, 1995). L'atrésie peut donc provoquer des changements de la physiologie du follicule, mimant les événements qui précèdent l'ovulation. Ces données récentes impliquent la révision des critères morphologiques de sélection des ovocytes qui étaient utilisés jusqu'ici. Cette observation est encourageante du point de vue des potentialités d'amélioration des résultats de la PIV si l'on se souvient que la grande majorité des follicules d'un ovaire, toutes tailles confondues, sont plus ou moins engagés sur la voie de l'atrésie (Carolan et al, 1995). Un des freins de l'avancée des connaissances reste la difficulté à établir un système de MIV/FIV/DIV pour des ovocytes individuels (Ferry et al, 1994, Blondin et Sirard, 1995) qui permettrait d'établir un lien strict entre les caractéristiques d'un follicule et la qualité de l'ovocyte qu'il contient.

L'état de la donneuse d'ovocytes peut également avoir son importance. En effet, Revel et al (1995) ont montré que le taux de développement était fortement réduit pour des ovocytes provenant de veaux prépubères (3 mois). Par contre, la compétence des ovocytes ne semble pas influencée par la période du cycle œstral de la donneuse (Takagi et al, 1992) ni par le fait qu'elle soit gestante (Behboody et al, 1992 ; Aurich et al, 1993). La compétence n'est pas non plus influencée par l'âge pour des donneuses pubères (Mermillod

et al, 1992b) ou par certains états pathologiques (Looney et al, 1994). Tout ceci constituant évidemment des arguments en faveur de la PIV en tant que méthode alternative dans des cas où la production d'embryons par la méthode "classique" de superovulation-insémination est impraticable. Dans ce domaine, la technique de ponction transvaginale des ovocytes sous guidage échographique (Ovum Pick-Up ou OPU) ouvre des perspectives considérables, permettant de répéter les collectes sur donneuses vivantes, sans traitement préalable (Kruip et al, 1994).

1.4. PERSPECTIVES

L'étape de MIV est donc un facteur limitant de la production d'embryons chez les trois espèces de ruminants. Les méthodes actuelles sont certes bien adaptées à certaines catégories d'ovocytes mais les ovocytes provenant des plus petits follicules donnent de moins bons résultats en termes de développement. Les avancées dans ce domaine passeront sans doute par une pré-culture des ovocytes avant la maturation, de manière à leur laisser le temps nécessaire pour se préparer à la fécondation et au développement. Du fait de la reprise spontanée de la méiose *in vitro*, la prolongation de la MIV passera par la maîtrise des mécanismes de blocage méiotique afin de laisser les ovocytes dans un état où ils seront à même de continuer à synthétiser les facteurs nécessaires au développement ultérieur. Des travaux sont en cours en vue d'élucider les mécanismes moléculaires du blocage méiotique et pour essayer de le maintenir *in vitro*. Il sera alors envisageable de travailler sur des ovocytes provenant de follicules de plus en plus petits et ainsi de tirer un parti maximum de l'immense potentiel reproducteur contenu dans les ovaires. Cela pourrait mener également à l'utilisation d'ovocytes de jeunes animaux, permettant un raccourcissement de l'intervalle de génération, ce qui serait un atout appréciable dans le cadre de schémas de sélection.

2. FÉCONDATION IN VITRO (FIV)

Cette étape est maintenant bien maîtrisée avec différentes méthodes de capacitation des spermatozoïdes (bovins : héparine ; petits ruminants : sérum de brebis en chaleur) et nous ne la détaillerons donc pas ici. Les techniques utilisées sont disponibles dans la littérature (Crozet, 1991 ; Cognié et al, 1991 ; Mermillod et al, 1992a). Parmi les perspectives dans ce domaine citons simplement l'utilisation de la FIV comme outil de diagnostic de la fertilité mâle (Marquant-Leguienne et Humblot, 1992) et l'utilisation de spermatozoïdes sexés (Cran et al, 1993).

3. DÉVELOPPEMENT IN VITRO (DIV)

3.1. SITUATION DU PROBLÈME

Placés en culture, les embryons de mammifères arrêtent spontanément leur développement à des stades divers. Chez les bovins, cet arrêt a lieu au moment du passage de 8 à 16 cellules. Plusieurs solutions ont été proposées successivement pour pallier ce blocage (revue par Catt, 1994). Lorsque des embryons sont placés dans les oviductes d'une receveuse provisoire (brebis ou lapine) ils accomplissent un développement normal jusqu'au stade de blastocyste. Cette observation a conduit à reconstituer *in vitro* un environnement mimant celui que rencontre l'embryon dans la lumière tubaire. Cette reconstitution implique la co-cultu-

re d'embryons avec des cellules de l'épithélium tubaire. Cette technique de co-culture a été utilisée avec succès dans plusieurs espèces (Eyestone et al, 1989) et des cellules provenant d'autres tissus, ainsi que des lignées cellulaires ont également été utilisées avec succès (cellules de granulosa, cellules trophoblastiques, lignées Buffalo Rat Liver ou BRL, cellules Vero). La difficulté d'obtenir des primocultures d'oviducte ou d'autres cellules offrant des caractéristiques embryotrophes reproductibles et les risques de contamination encourus a incité à rechercher différentes alternatives.

L'utilisation de milieux conditionnés a constitué la première alternative aux systèmes de co-culture (Mermillod et al, 1993). Il s'agit de milieux ayant été en contact avec des cellules en culture qui sont ensuite repris, centrifugés, aliquotés et congelés puis réutilisés pour la culture d'embryon. Des monocouches de cellules d'oviducte ont été utilisées ainsi que d'autres cellules. Plus récemment sont apparus des milieux définis ou semi-définis dont la composition a été établie pour répondre aux besoins de l'embryon (revue par Gardner, 1994) et donnant de bons résultats sans le support de cellules nourricières ou de facteurs sériques.

Outre l'aspect quantitatif (rendement du développement), la viabilité des embryons produits est à prendre en considération. En effet, les embryons produits *in vitro* résistent moins bien à la congélation et produisent des taux de gestation inférieurs à leurs homologues *in vivo*.

3.2. TECHNIQUES

Plusieurs techniques de culture d'embryons ont été décrites et sont encore utilisées dans différents laboratoires et pour différentes espèces. A Nouzilly, nous utilisons une technique unique pour les trois espèces traitées. Après fécondation, les ovocytes sont débarrassés des cellules de cumulus qui les entourent (chez les petit ruminants cette étape a lieu avant la fécondation), lavés et placés dans des microgouttes de fluide d'oviducte synthétique (Takahashi et First, 1994, Synthetic Oviduct Fluid ou SOF, 1µl par embryon, groupes de 15-30 embryons environ) recouvertes d'huile minérale. Les embryons sont alors cultivés à 39°C en atmosphère humide de 5 % CO₂, 5 % O₂ et 90 % N₂. Après 24h, le taux de clivage est déterminé et on ajoute du FCS à une concentration de 10 %. Les embryons sont replacés en culture pour 7 jours supplémentaires, sans renouvellement de milieu. Les critères utilisés pour l'évaluation du succès d'une culture d'embryons sont généralement : le pourcentage d'embryons atteignant le stade de blastocyste (7 ou 8 jours), la morphologie des blastocystes, leur nombre de cellules totales et la répartition de ces cellules entre le tro-

phectoderme et l'amas interne. Toutefois, ces critères ne sont pas suffisants pour évaluer la viabilité des embryons produits et il reste nécessaire de transférer des embryons afin de déterminer la qualité d'un système de culture.

3.3. AMÉLIORATIONS RÉCENTES

La mise en place du système de culture en milieu synthétique a constitué une nette amélioration du système de PIV pour les trois espèces. Cette amélioration concerne le taux de développement, sa reproductibilité et la qualité des embryons produits, mesurée par leur nombre de cellules et taux de gestation après transfert (Poulin et al, 1994; Carolan et al, 1995). L'utilisation d'albumine bovine (BSA) et de sérum reste un problème concernant la reproductibilité du système et sa qualité sanitaire. Le tableau 3 montre que, chez les bovins, la BSA augmente le taux final de développement au stade blastocyste (de 21 à 31 %). Le FCS accélère l'apparition de ces blastocystes (de 17 à 26 % au jour 6 de culture). Des résultats similaires ont été obtenus en culture d'embryons ovins où le sérum augmente également la viabilité des blastocystes après transfert (Poulin et al, 1994). Cependant, nous avons montré récemment que l'insuline et l'IGF-II, pouvaient produire un effet équivalent à celui de la BSA et approchant celui du FCS (Figure 3). Ceci constitue un premier pas vers la mise au point de milieux totalement définis pour le développement embryonnaire *in vitro*.

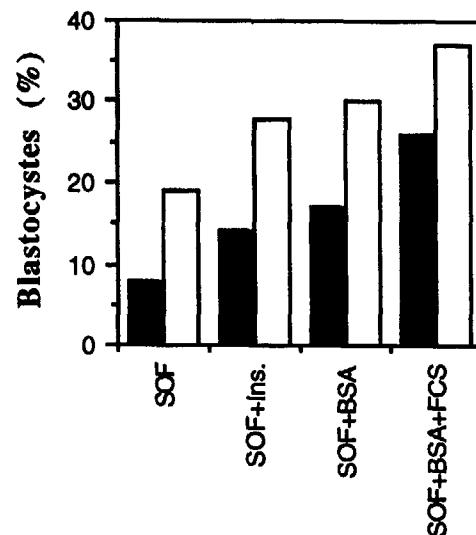


Figure 3 : Taux de développement d'embryons bovins produits par MIV-FIV et cultivés dans du fluide d'oviducte synthétique (SOF), du SOF additionné d'insuline 1µg/ml (SOF+Ins.); de BSA 3mg/ml (SOF+BSA); de BSA et FCS 10% (SOF+BSA+FCS). Culture de 6 (barres pleines) et 8 jours (barres vides).

Tableau 3 : Effet de la BSA (3mg/ml) et du FCS (10%) ajoutés au SOF sur le développement d'embryons bovins *in vitro*.

Traitement	Ovocytes	Blastocystes J6 (%)	Blastocystes J8 (%)	Blastocystes J8/clivés (%)
SOF	308	8 ^a	21 ^a	26 ^a
SOF+BSA	272	17 ^b	31 ^b	36 ^b
SOF+BSA+FCS	284	26 ^c	29 ^b	36 ^b

Total de 8 répliques. *abc*, valeurs différant significativement ($p < 0,05$; Chi-carré)

3.4. PERSPECTIVES

Il apparaît donc clairement que des cellules somatiques sont capables de rendre permissif un milieu inadapte aux embryons. Cette adaptation semble supportée par des facteurs solubles qui ne sont pas spécifiques du tissu ni de l'espèce (Mermillod et al, 1993). Certains au moins seraient contenus dans le sérum foetal, ce qui expliquerait l'effet de celui-ci en supplément de milieux définis. Cependant ces facteurs ne semblent pas strictement indispensables au développement embryonnaire puisque celui-ci peut se faire sans support cellulaire et sans sérum si le milieu est mieux adapté aux besoins de l'embryon (SOF). Il est donc clair que l'avenir est aux milieux définis. L'insuline et l'IGF auraient un effet sur le développement mais la composition pré-

se en facteurs de croissance dans les milieux définis reste à déterminer, ainsi que la chronologie de l'action de ces facteurs. Les méthodes de culture utilisées actuellement offrent des rendements élevés lorsque les embryons cultivés proviennent d'ovocytes soigneusement sélectionnés (taille et qualité des follicules) mais la viabilité des embryons produits reste inférieure à celle des embryons obtenus in vivo (Hasler et al, 1995), c'est donc sur l'aspect qualitatif des techniques de développement in vitro que le travail futur devra être centré. De ce point de vue, la mise en évidence de critères biochimiques liés à la viabilité embryonnaire serait une aide considérable et permettrait d'accélérer le travail en évitant le recours systématique au transfert des embryons.

RÉFÉRENCES

- BEHBOODI E., ANDERSON G.B., BONDURANT R.H., 1992. *Theriogenology*, 38, 1077-1084
- BLONDIN P., SIRARD M.A., 1995. *Molec. Reprod. Dev.*, 41:54-62
- BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F., DRESSEL M.A., 1982. *Biol. Reprod.*, 27, 147-158
- CAROLAN C., LONERGAN P., MONGET P., MONNIAUX D., MERMILLOD P., 1995a. *Theriogenology*, 43, 182
- CAROLAN C., LONERGAN P., MONGET P., MERMILLOD P., 1995b. *J. Reprod. Fertil.* 15, Abstr.211
- CAROLAN C., LONERGAN P., VAN LANGENDONCKT A., MERMILLOD P., 1995c. *Theriogenology*, 43, 115-1128
- CATT J.W. 1994. *Cell Biol. Int.*, 18, 1155-1162
- COGNIE Y., GUERIN Y., GUYADER C., POULIN N., CROZET N., 1991. *Theriogenology*, 35, 393-400
- CRAN D.G., JOHNSON L.A., MILLER N.G.A., COCHRANE D., POLGE C., 1993. *Vet. Rec.*, 9, 40-41
- CROZET N., HUNEAU D., DE SMEDT V., THERON M.C., SZOLLOSI D., TORRES S., SEVELLEC C., 1987. *Gamete Res.*, 16, 159-170
- CROZET N., 1991. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 43, 235-243
- CROZET N., AHMED-ALI M., DUBOS M.P., 1995. *J. Reprod. Fertil.*, 103, 293-298
- DE SMEDT V., CROZET N., AHMED-ALI M., MARTINO A., COGNIE Y., 1992. *Theriogenology*, 37, 1049-1074
- DE SMEDT V., CROZET N., GALL L., 1994. *J. Exp. Zool.*, 269, 128-139
- FERRY L., MERMILLOD P., MASSIP A., DESSY F., 1994. *Theriogenology*, 42, 445-453
- DRIANCOURT M.A., 1991. *Theriogenology*, 35(1), 55-79
- EYESTONE W.H., FIRST N.L., 1989. *J. Reprod. Fertil.*, 85, 715-720
- GARDNER D.K., 1994. *Cell Biol. Int.*, 18, 1163-1179
- GORDON I., 1991. *Embryo Transfer Newsletter*, 9(2), 4-9
- HASLER J.F., 1994. *The Compendium*, 16, 1062-1072
- HASLER J.F., HENDERSON W.B., HURTGEM P.J., JIN Z.Q., MCCAULEY A.D., MOWER S.A., NEELY B., SHUEY L.S., STOKES J.E., TRIMMER S.A., 1995. *Theriogenology*, 43, 141-152
- KRUIP T.A.M., BONI R., WURTH Y.A., ROELOFSEN M.W.M., PIETERSE M.C., 1994. *Theriogenology*, 42, 675-684
- LONERGAN P., CAROLAN C., MERMILLOD P., 1994a. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34, 329-339
- LONERGAN P., MONAGHAN P., RIZOS D., BOLAND M.P., GORDON I., 1994b. *Molec. Reprod. Dev.*, 37(1), 48-53
- LONERGAN P., CAROLAN C., MERMILLOD P., 1995. *J. Reprod. Fertil.*, 15, Abstr.212
- LOONEY C.R., LINDSEY B.R., GONSETH C.L., JOHNSON D.L., 1994. *Theriogenology*, 41(1), 67-72
- MARQUANT-LE GUIENNE B., HUMBLLOT P., 1992. *Ann. Zootech.*, 41, 361-370
- MERMILLOD P., MASSIP A., DESSY F., 1992a. *Int. J. Dev. Biol.*, 36, 185-195
- MERMILLOD P., WILS C., MASSIP A., DESSY F., 1992b. *J. Reprod. Fertil.*, 96, 717-723
- MERMILLOD P., VANSTEENBRUGGE A., WILS C., MOURMEAUX J.L., MASSIP A., DESSY F., 1993. *Biol. Reprod.*, 49, 582-587
- POULIN N., EVANS G., COGNIE Y., MERMILLOD P., 1994. *Proc. 10eme Réunion AETE*, 1994;238
- REVEL F., MERMILLOD P., PEYNOT N., RENARD J.P., HEYMAN Y., 1995. *J. Reprod. Fertil.*, 103, 115-120
- TAKAGI M., TSUKIHARA T., NISHIKATA Y., SUZUKI T., 1993. *Theriogenology*, 40, 135-147
- TAKAHASHI Y., FIRST N.L., 1992. *Theriogenology*, 37, 963-978
- THIBIER M., GUERIN B., 1991. *Rec. Med. Vet.*, 167(3/4), 249-258