

**MULTIPLICATION DES EMBRYONS CHEZ LES BOVINS  
POSSIBILITES ACTUELLES ET FUTURES**

**F. Ectors, J.F. Beckers, F.J. Ectors, A. Delval, K. Touati.  
Chaire d'Obstétrique et des Troubles de la Reproduction  
Centre I.R.S.I.A. Cerad Section III  
Faculté de Médecine Vétérinaire  
U.Lg. - Cureghem**

## 1. Introduction

La reproduction et la multiplication d'animaux d'élite constitue l'objectif primordial de tous les éleveurs. Malheureusement dans l'espèce bovine, la sélection du patrimoine génétique est en partie limitée par des facteurs tels que la prolificité, la durée de la gestation et l'intervalle entre les générations. Depuis ces dernières décades de nouvelles techniques sont venues au secours des éleveurs et des zootechniciens.

En effet, chez le mâle, l'insémination artificielle et la congélation du sperme ont permis d'utiliser au maximum la potentialité des taureaux primés, et cela d'autant plus facilement que chez le mâle la spermatogenèse est un phénomène continu depuis la puberté.

Chez la femelle, par contre, les choses ne sont pas aussi simple. Très tôt, au cours de la vie embryonnaire, les cellules germinales prennent naissance au niveau de l'entoblaste extra-embryonnaire et vont coloniser les crêtes génitales où elles se multiplient activement. Tandis que cette multiplication se poursuit, les premières ovogonies entament leur méiose et se bloquent au stade diplotène de la prophase méiotique. Dès la fin de la gestation, cette multiplication s'arrête et à ce moment, la femelle possède tout son capital reproducteur. Une période quiescente très longue va débiter, durant laquelle l'ovogonie est stockée sous forme de follicule primordial (Figure 1). A la naissance, l'ovaire du veau femelle contient environ 100.000 ovogonies dont malheureusement la plupart vont subir l'atrésie et seules quelques unes d'entre elles serviront à la reproduction.

Un tel gaspillage ne pouvait laisser les biologistes insensibles et ils se sont attachés à préserver ce capital par différents moyens : tels la superovulation et la transplantation embryonnaire, la micromanipulation, la séparation des blastomères et le clonage.

## 2. Multiplication par action sur la folliculogénèse : la superovulation

La superovulation a pour but de stimuler la folliculogénèse de manière à obtenir la maturation simultanée de plusieurs follicules et à donner au transfert d'embryons sa pleine efficacité.

La folliculogénèse englobe toutes les étapes qui transforment le follicule primordial en follicule mûr ou de De Graaf.

Classiquement, la régulation hormonale de la folliculogénèse est divisée en deux grandes périodes : l'une allant du follicule primordial jusqu'au follicule secondaire ou préantral, l'autre s'étendant du follicule préantral au follicule mûr ou cavitaire (Figure 2.).

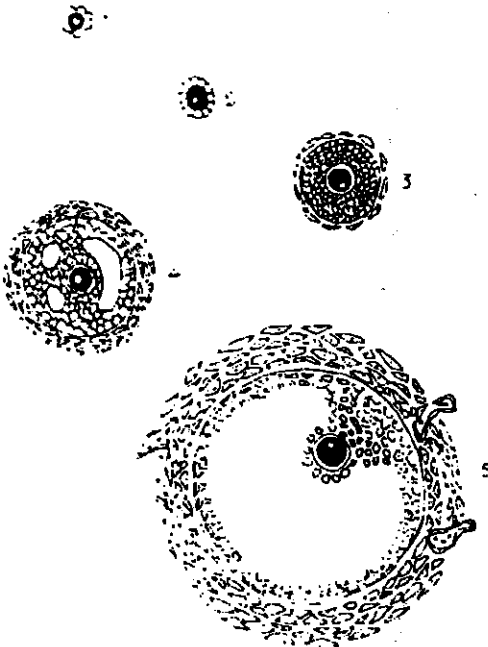


Fig. 1.

1. follicule, primordial
2. follicule, primaire
3. follicule, secondaire
4. follicule, tertiaire
5. follicule, de De Graaf

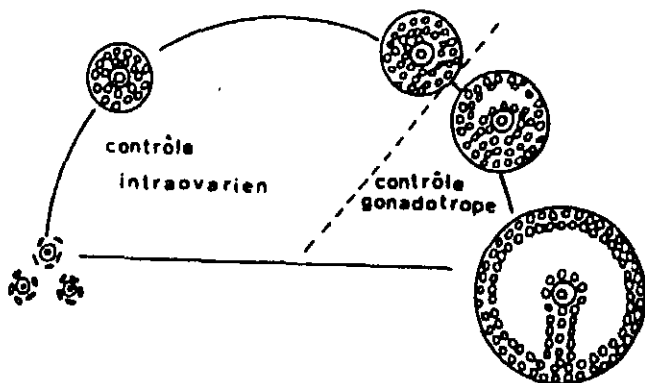


Fig. 2

La première période serait sous contrôle intra-ovarien tandis que la seconde dépendrait des hormones gonadotropes hypophysaires.

La nature des facteurs intra-ovariens de régulation n'est pas encore parfaitement connue mais au nombre de ceux-ci il semble que l'on puisse signaler l'EGF (facteur de croissance), le FGF (facteur de croissance fibroblastique), le TGFB (transforming growth factor) qui pourrait intervenir dans la multiplication des cellules de la granuleuse et favoriser la croissance du follicule.

Outre l'action de ces facteurs intra-ovariens, il paraît de plus en plus admis aujourd'hui que les hormones gonadotropes hypophysaires et notamment la FSH puissent intervenir durant la première période de croissance du follicule. En effet, les ovaires de ratte âgée de un jour et transplantés dans un milieu riche en gonadotropines voient leur folliculogénèse se développer activement. En outre beaucoup de follicules primordiaux entament leur développement avant la puberté probablement grâce aux niveaux élevés de gonadotropines en phase prépubertaire et enfin des injections journalières

à partir de la naissance d'un antisérum contre les gonadotrophines altèrent fortement le recrutement des follicules primordiaux.

A partir du stade préantral, le follicule est sous la dépendance trophique des gonadotropines hypophysaires qui le conduisent jusqu'au stade de follicule mûr: la FSH stimule la multiplication des cellules de la granulosa et la formation de l'antrum, la LH agit sur les cellules de la thèque et favorise la formation des androgènes, qui sont transformés en oestrogènes grâce à l'activité aromatasase des cellules de la granulosa. Cette évolution est entièrement sous la dépendance de ce contrôle hormonal car dans le cas où l'une ou l'autre des gonadotropines est déficiente, le follicule s'atrophie.

Si l'évolution est favorable, le  $17\beta$  oestradiol se fixe sur ses récepteurs et en synergie avec la FSH, assure la multiplication des cellules de la granulosa contribuant à la formation du liquide folliculaire et à l'agrandissement de l'antrum. En fin de croissance, la FSH induit la formation de récepteurs à LH au niveau de la granulosa, la préparant ainsi à la formation du corps jaune.

Chez la vache, de tous les follicules qui débutent leur croissance seulement un ou deux arriveront à maturité au moment des chaleurs, ce sont les follicules dominants, les autres subiront l'atrophie. D'un point de vue histologique, celle-ci se traduit par une augmentation des espaces intercellulaires, la disparition des jonctions ouvertes (gap junctions), la picnose des noyaux et une diminution des récepteurs à LH et FSH.

Le mécanisme hormonal qui commande l'atrophie est encore imparfaitement connu mais il semble de plus en plus probable que l'on s'oriente vers un double contrôle, endocrine et paracrine, l'un s'exerçant par voie générale et l'autre par voie locale. Le premier agirait par l'intermédiaire de l'inhibine sécrétée par les cellules de la granulosa du follicule dominant. Cette hormone passe dans la circulation et exerce un feed-back négatif sur la sécrétion de FSH hypophysaire. De ce fait, les follicules privés du rôle trophique de

la FSH dégénèrent tandis que le follicule dominant, suffisamment développé, continuera sa croissance. Le contrôle local s'exercerait également par l'intermédiaire de l'inhibine qui agirait en diminuant la vascularisation et en provoquant l'ischémie des follicules en développement (Thibault, 1988; Steinberger et Ward, 1988). Si l'action centrale de l'inhibine paraît bien prouvée, son rôle paracrine n'est pas encore entièrement démontré.

En fonction des éléments que nous venons de développer, il semble que seules les hormones à activité gonadotrope soient utilisables pour stimuler la croissance folliculaire. Deux hormones sont disponibles : la PMSG et la FSH.

## 2.1. Traitement à base de PMSG

La PMSG est sécrétée au niveau des "endometrial cups" chez la jument gravide et elle se retrouve dans le sang de celle-ci du 40e au 150e jour de la gestation. C'est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 64.000 daltons, qui contient 10 à 13 % d'acide sialique ce qui explique sa demi-vie assez longue (4 à 6 jours).

Pour obtenir la superovulation, la PMSG est injectée par voie intra-musculaire à la dose de 2500 à 3000 UI durant la phase lutéale du cycle oestral, et plus spécialement entre les jours 8 et 12. Deux jours plus tard, une injection de prostaglandines permet d'arrêter la phase lutéale et induit le retour des chaleurs au cours desquelles 2 inséminations artificielles sont pratiquées. La récolte des embryons se pratique 7 jours plus tard.

Tableau 1 : Schéma de traitement au moyen de PMSG

Jours du cycle	Traitements
J0 au oestrus	
J9	2.500 U.I. PMSG
J11	PGF2a matin
J13	I.A. matin et soir
J0	Récolte d'embryons
J7	

Si la longue demi-vie de la PMSG permet de pratiquer la superovulation en une seule injection, elle présente le désavantage de favoriser l'apparition de follicules kystiques qui engendrent un climat hormonal néfaste pour les embryons.

Pour contrecarrer cette action, l'équipe Gantoise (Bouters, R. et al., 1980) a préconisé l'injection I.V. d'un serum anti-PMSG (1800 U.I.), le jour des chaleurs de façon à neutraliser l'activité PMSG résiduelle. Cette technique permet d'augmenter nettement le nombre d'embryons utilisables.

Tableau 2 : Résultats des traitements de superovulation

Traitement	Nombre d'animaux	Embryons récoltés	Embryons transférables
PMSG	102	6,2	3,1
PMSG+anti-PMSG	34	8,4	4,5

## 2.2. Traitement à base de pFSH

Tableau 3 :

Jours du cycle		Race Pie Noire	Race B.B.B.
		32 mg de pFSH	40 mg de pFSH
J0 = chaleurs		-	-
J9	matin	6 mg	8 mg
	soir	6 mg	8 mg
J10	matin	5 mg	6 mg
	soir	5 mg	6 mg
J11	matin	3 mg + PgF2 $\alpha$	4 mg + PgF2 $\alpha$
	soir	3 mg	4 mg
J 12	matin	2 mg	2 mg
	soir	2 mg	2 mg
J 13 = J0	matin	I.A.	I.A.
	soir	I.A.	I.A.
J 7		Récolte d'embryons	

Nous utilisons une FSH pure préparée dans notre laboratoire (Beckers J.F., 1987; Beckers et al, 1987) à laquelle nous ajoutons des quantités connues de LH en vue de favoriser la maturation folliculaire. La demi-vie de la FSH n'étant que de 6 heures, il est indispensable de pratiquer 2 injections I.M. par jour.



Tableau 4 : Résultats

Traitements	Nombre d'animaux	Embryons récoltés	Embryons transférables
pFSH	184	8,8	5,2

Si le nombre total d'embryons produits ne paraît pas sensiblement augmenté, par contre, le nombre d'embryons utilisables est beaucoup plus élevé. Ces résultats plus favorables sont probablement dûs au fait que les hormones homologues (FSH/LH) stimulent les récepteurs d'une manière plus physiologique.

### 2.3. Préparation de l'ovaire à la superovulation ou "Priming"

Les résultats d'un traitement de superovulation dépendent de l'état de la population folliculaire au moment de son instauration. C'est ainsi que la présence d'un follicule "dominant" lors d'administration des gonadotropines en compromet les résultats. C'est pour cette raison que le traitement doit être instauré en phase lutéale, car c'est à ce moment que les chances d'observer un follicule dominant sont les plus faibles.

Ainsi que nous venons de le voir, la FSH paraît être l'hormone gonadotrope la plus impliquée dans la folliculogénèse puisqu'elle intervient non seulement dans la transformation du follicule tertiaire en follicule de De Graaf, mais elle paraît même intervenir pour stimuler la formation des follicules secondaires et peut-être les stades plus précoces. Partant de ces éléments, nous avons tenté de préparer l'ovaire à la superovulation par des injections de FSH pratiquées en début du

Trente sept vaches ont reçu 25 µg de pFSH pure (correspondant à 2,5 mg unité Armour) par voie intramusculaire aux jours 3 et 4 du cycle oestral tandis que 30 vaches témoins ont reçu un traitement identique à base de sérum physiologique (NaCl 0,9 %). Entre les jours 9 et 11 du cycle oestral, les 67 vaches ont été soumises à un traitement de superovulation utilisant une dose totale de 320 µg (32 mg Unité Armour) de pFSH (rapport LH/FSH = 20%) à concurrence de 2 injections par jour à 12 heures d'intervalle pendant 4 jours. Une injection de PgF2α (2 ml de Reprodine-Bayer) est faite au troisième jour du traitement de superovulation. Quarante huit heures après l'injection de prostaglandines, les vaches sont inséminées deux fois à 8 heures d'intervalle. Les embryons sont récoltés par voie cervicale au J7 du cycle.

Tableau 5 : Résultats (période hivernale du 01/12/88 au 31/03/89)

	Nb de vaches	Embryons		Trans/récolt
		Récoltés	Transférables	
Contrôles	30	6,4	3,6	56,2%
Prétraités	37	11,7	7,1	60,7%

Ces premiers résultats sont très encourageants car le nombre d'embryons transférables a pratiquement doublé. Des recherches ultérieures sont nécessaires pour déterminer avec plus de précision le nombre d'injections à effectuer, la dose à utiliser ainsi que la période idéale du traitement par rapport au cycle oestral.

En dépit des progrès accomplis, le nombre moyen d'embryons récupérés n'est pas énorme par rapport au nombre de follicules primordiaux présents dans les ovaires. Chez la

reproducteur n'est pas chose aisée. Si l'on désire multiplier intensément les souches d'élites, il faudra s'adresser à d'autres techniques telles que la micromanipulation, l'isolement des blastomères et le clonage.

### 3. Multiplication par action sur l'embryon

#### 3.1. Micromanipulation

La bissection des embryons peut-être réalisée aux stades morula ou blastocyste et permet de doubler le nombre d'embryons récoltés. La méthode a été décrite par Oziil (1982) et a été encore simplifiée depuis (Massip, A. Ann. Méd. Vét., 1985).

L'embryon est placé dans une boîte de Pétri au milieu d'une goutte de PBS additionnée de 10% de sérum foetal et recouverte d'huile (diméthylpolysiloxane). La boîte de Pétri est alors placée sur la platine du microscope. Deux micromanipulateurs (Leitz) disposés de part et d'autre permettent de commander indépendamment et simultanément les deux micro-instruments :

- une micropipette de 80 à 90  $\mu\text{m}$  de diamètre extérieur, et de 30mm environ de diamètre intérieur, fabriquée à partir d'un tube capillaire de 1,5 x 150 mm préalablement étiré et façonné ensuite à l'aide d'une microforge De Fonbrune. Cette micropipette sert à positionner et à maintenir l'embryon par aspiration.

- un minuscule microscalpel obtenu par usinage d'une lame de rasoir.

L'embryon est maintenu à l'aide de la micropipette et la division est pratiquée selon un plan sagittal en abaissant verticalement le microscalpel. Le fil tranchant du microscalpel doit être exactement parallèle au fond de la boîte de Petri.

Les demi-embryons sont replacés ou non dans une zone pellucide puis, dans la mesure du possible, mis quelques heures en culture pour leur permettre de se reconstituer avant d'être transférés ou congelés.

La bissection des embryons permet de doubler le nombre d'embryons utilisables et d'augmenter ainsi le nombre de veaux produits par donneuse. Cette bissection permet en outre la production de jumeaux homozygotes dont l'intérêt pour la recherche est loin d'être négligeable.

L'embryon peut-il supporter plus d'une section ? Il semble bien que oui car dans notre laboratoire nous avons obtenu des gestations suite aux transferts de 1/3 et de 1/4 d'embryon, mais le pourcentage de gestations diminue proportionnellement au nombre de sections. Les dégâts causés à l'embryon par ces sections multiples sont probablement trop importants, si bien que le nombre de cellules intactes devient rapidement insuffisant pour reformer un blastocyste.

### 3.2. Utilisation de blastomères isolés

Pour multiplier un embryon, on peut envisager de séparer les différents blastomères qui le constituent au stade précoce de son développement.

Si l'on sépare les deux blastomères d'un embryon au stade II, on peut obtenir deux individus, ce qui prouve que le génome de chaque blastomère est encore capable de reconstituer un individu complet. Cette possibilité est conservée, selon les espèces, jusqu'aux stades IV, VIII ou XVI cellules, avant la différenciation des blastomères.

Cette technique a permis d'obtenir des foetus normaux chez la souris, le lapin et le mouton (Tarkowski, 1967; Willadsen, 1979 et 1981; O'Brien, 1984).

En 1983, Willadsen et Fehilly ont remarqué que lorsqu'un embryon se divise, il y a toujours un certain asynchronisme dans les divisions cellulaires et que la première cellule, qui se divise chez un embryon aux stades II ou IV,

fournit le bouton embryonnaire tandis que les autres donneront les tissus extra-embryonnaires. Etant donné que les blastomères du stade VIII ont un cycle de division d'avance par rapport aux blastomères du stade IV, en combinant un blastomère de stade VIII avec un stade IV, le premier devrait donner le bouton embryonnaire et le second les tissus extra-embryonnaires. Ils ont aussi obtenu des quintuplés à partir d'une combinaison de blastomères provenant d'un embryon à 8 cellules avec ceux provenant de 2 embryons à 4 cellules.

Si la séparation des blastomères est un moyen valable pour multiplier les embryons, cette technique présente très vite des limites car elle se heurte à l'épuisement rapide des blastomères que l'on tend à multiplier par séparation successive.

#### 4. Le clonage

Reproduire un individu à partir d'une seule de ses cellules est théoriquement possible. Chaque cellule somatique possède, en effet, dans son noyau le jeu complet de chromosomes qui a commandé son développement. Il suffit en principe de prélever un de ces noyaux et de l'insérer dans un ovocyte au préalable énucléé. L'oeuf ainsi reconstitué va, en se divisant, donner naissance à un individu identique au donneur. C'est ce qu'on appelle le clonage.

En pratique, les choses ne sont pas aussi simples, car le noyau des cellules somatiques se différencie très vite.

Pour arriver à cloner un individu adulte, il faut donc parvenir à dédifférencier le noyau, recherche de longue haleine qui, si elle aboutit, permettra des découvertes importantes.

Si le transfert de noyaux à partir de cellules somatiques d'organismes adultes paraît aujourd'hui chose très difficile, le transfert de noyaux de cellules embryonnaires est parfaitement réalisable.

C'est en 1952 que Briggs et King ont réussi à implanter les noyaux de cellules embryonnaires de grenouille dans des oeufs dont le noyau avait été enlevé. Ils ont observé la naissance de têtards, mais le pourcentage de réussite devenait de plus en plus faible à mesure qu'ils utilisaient des cellules embryonnaires plus âgées. Tout se passe comme si ces dernières étaient déjà trop différenciées pour permettre l'expression de tous les gènes nécessaires au développement de l'embryon.

Chez les mammifères, l'opération devient plus compliquée car la dimension des oeufs est plus petite (60 à 200  $\mu\text{m}$  contre 1mm, chez les batraciens), ils sont beaucoup plus fragiles et la différenciation du noyau embryonnaire est plus rapide. C'est en 1981, que Hoppe et Illmensee ont annoncé le premier transfert de noyau chez la souris. Ils ont prélevé le noyau d'un blastomère et l'ont transféré dans un oeuf fécondé énucléé (Fig. 3). L'opération répétée plusieurs fois avec le même embryon reproduisait des individus tous semblables et qui avaient le même patrimoine génétique que l'embryon donneur. Willadsen (1986) travaillant sur des embryons de mouton a effectué le transfert de noyaux provenant des blastomères d'embryons de 8 à 16 cellules dans un ovocyte énucléé en vue d'en effectuer la fusion. Ces expériences ont abouti à des gestations et à la naissance de nouveaux-nés normaux.

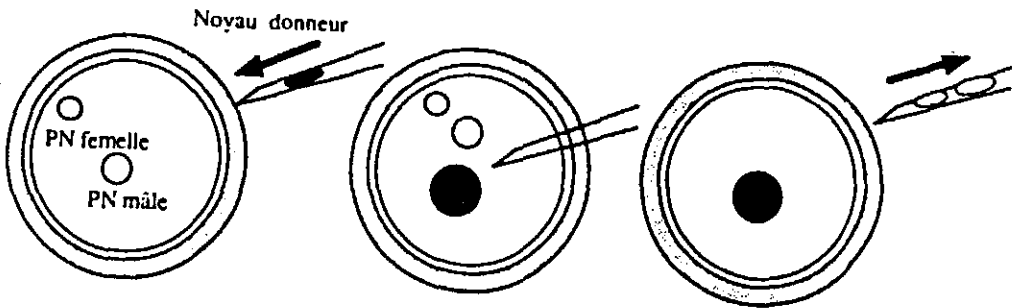


Fig. 3: Transfert de Noyau

Le transfert de noyaux chez les bovins est difficilement réalisable pour les raisons déjà invoquées : faible taille, fragilité de l'oeuf et noyau difficilement visible. Actuellement, le meilleur moyen de réaliser le clonage chez les embryons de bovins est d'injecter un blastomère dans l'espace périvitellin d'un ovocyte énucléé et d'en réaliser la fusion (Fig.4). Ces blastomères proviennent d'embryons aux premiers stades de développement. Ils sont traités à la pronase pour éliminer la zone pellucide puis les cellules sont séparées au moyen d'une fine aiguille. Cette opération est délicate car la membrane cytoplasmique ne peut-être soumise à des chocs importants. Cette technique a été utilisée avec succès chez la souris (Kubiak et Tarkowski, 1985), (Tsunoda et coll., 1987) et chez le mouton (Willadsen, 1986), elle n'a pas encore été effectuée chez les bovins mais elle doit être réalisable à la condition de pouvoir disposer en grand nombre d'ovocytes ou de zygotes énucléés ainsi que de jeunes blastomères au stade II,IV ou VIII cellules.

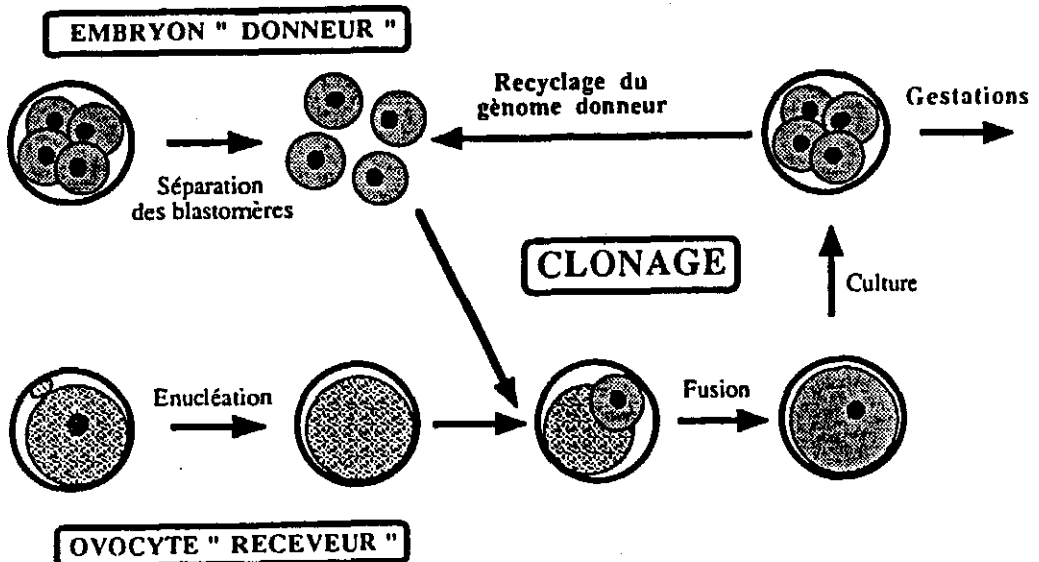


Fig. 4 : Transfert de blastomères

La production "in vivo" de tels embryons est fort coûteuse car elle exige un matériel animal important. A ce stade, les embryons se trouvent encore dans l'oviducte et ne peuvent être récoltés que par lavage de ces derniers.

Pour ces raisons, nous avons opté pour la production d'embryons "in vitro" à partir d'ovocytes prélevés à l'abattoir, ceux-ci sont placés dans un milieu favorable à leur maturation, puis sont fécondés et mis en culture jusqu'au stade désiré.

Les follicules de 1 à 5 mm sont ponctionnés, à un stade quelconque du cycle oestral, dans les 30 minutes qui suivent l'abattage et placés dans du TCM 199 Hepes à 39°C jusqu'au moment de leur traitement au laboratoire. Seuls sont retenus les ovocytes entourés de leur corona radiata et de quelques couches de cellules de la granuleuse. Des groupes de 15 ovocytes sont cultivés dans 1 ml TCM 199 complété d'1 µg de 17 β oestradiol, de 0,5 µg de FSH et de 5µg de LH à 39°C sous atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. La durée totale de la culture est de 22 heures.

Passé ce délai, les ovocytes sont considérés comme matures quand ils répondent aux critères suivants :

- expansion du cumulus
- apparition du 1er globule polaire
- augmentation de l'espace périvitellin

Ces ovocytes sont ensuite fécondés par des spermatozoïdes capacités suivant la méthode de First et Parrish (1987). Celle-ci consiste d'abord en une sélection des spermatozoïdes les plus mobiles par migration ascendante (Swim-up) suivie d'une capacitation par exposition à l'héparine et PHE (Penicillamine-Hypotaurine-Epinéphrine) dans une solution de Tyrode. Après plusieurs lavages dans du Tyrode, les ovocytes mûrs sont ajoutés au milieu de fécondation. Celle-ci est réalisée dans des tubes contenant ± 5 ovocytes et ± 200.000 spermatozoïdes dans 500 µl de Tyrode. Les ovocytes restent au contact des spermatozoïdes pendant 8 heures à 39° C et sous atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Après la fécondation, les zygotes sont placés pendant 4 jours dans l'oviducte d'un hôte intermédiaire tel que celui de la lapine pseudogestante.



Tableau 6 : Résultats

Nb d'ovocytes traités	373
Maturation(critères morphologiques)	99,5% (371/373)
Fécondation(critères morphologiques)	98,6% (366/371)
Nombre d'embryons récupérés après passage dans les lapines	51,1% (190/366)
Développement in vivo après passage dans les lapines	17,4% (33 morulas/190)
% = Nb développés/Nb traités	8,8%
Nombre d'embryons transférés	13
Nombre de vaches gestantes	3
Nombre de naissances	1

Les résultats enregistrés lors de la maturation des ovocytes, de leur fécondation et des premiers développements sont très encourageants et permettront de disposer pour le clonage d'un grand nombre d'embryons aux premiers stades de développement.

Cependant, le clonage ne pourra porter ses fruits que lorsqu'on pourra disposer d'une technique capable de favoriser le développement des embryons de bovins jusqu'au stade morula ou blastocyste qui peuvent être soit transférés directement soit congelés.

Dans notre technique, c'est le passage par l'oviducte de la lapine qui constitue un handicap sérieux, nous comptons remplacer cette étape en cultivant les embryons dans du milieu TCM 199 préparé avec des cellules épithéliales d'oviducte.

## 5. Conclusion

Nous pouvons constater que depuis ces dernières années, la multiplication des animaux d'élite a fait d'énormes progrès. Une première étape fut franchie par la transplantation embryonnaire et la congélation des embryons, une deuxième étape par la micromanipulation et la section des embryons et enfin une troisième étape est en cours de réalisation à savoir la reproduction asexuée.

## RESUME

Depuis plusieurs années de nombreux travaux de recherche ont pour but d'améliorer le potentiel reproducteur des animaux domestiques. Les auteurs réalisent une revue de ces différentes méthodes, particulièrement : la superovulation et le priming, la micromanipulation et le clonage.

La superovulation permet l'accroissement du nombre de descendants en augmentant le nombre d'ovocytes disponibles lors de chacun des cycles. Par une série d'injections de FSH en fin de cycle, précédée en début de cycle par des injections sensibilisantes (priming), on obtient un accroissement du nombre de follicules venant à maturation et pouvant être exploités pour la reproduction. La micromanipulation permet une multiplication des embryons en les sectionnant en deux ou plusieurs fragments qui réimplantés donneront naissance à plusieurs foetus. Des blastomères isolés aux stades précoces peuvent également être utilisés, cependant on constate très rapidement une perte du pouvoir de différenciation. Le clonage permet lui de reproduire un individu à partir d'une seule de ses cellules dont le noyau sera prélevé et inséré dans un ovocyte au préalable énucléé. Cependant, en pratique, si le transfert de noyaux à partir de cellules somatiques de l'organisme adulte paraît aujourd'hui chose très difficile, le transfert de noyaux de cellules embryonnaires est parfaitement réalisable.

## SAMENVATTING

Sedert verscheidene jaren wordt onderzoek gedaan naar het verbeteren van de voortplantingsresultaten bij de huisdieren. Er wordt een overzicht gegeven van de verschillende methodes die hierbij worden toegepast, meer bepaald de superovulatie en priming, de micromanipulatie en het cloneren van embryo's.

Superovulatie laat toe om meer nakomelingen te bekomen door het verhogen van het aantal ovocyten dat beschikbaar komt bij elke cyclus. Door een reeks injecties van FSH op het einde van de cyclus, voorafgegaan door sensibiliserende injecties (priming) in het begin van de cyclus, verhoogt het aantal follikels dat tot rijping komt en dat dus beschikbaar komt voor de voortplanting.

Micromanipulatie laat toe om meer embryo's te bekomen door splitsen in 2 of meer fragmenten die, na overplanten, ontwikkelen tot meerdere foeti. Geïsoleerde blastomeren kunnen eveneens gebruikt worden doch deze cellen verliezen zeer snel de mogelijkheid tot differentiatie. Onder cloneren verstaat men de voortplanting van een individu uitgaande van één van zijn eigen cellen, waarvan de kern wordt getransplanteerd in een vooraf geëucleëerde eicel. Op dit ogenblik is kerntransplantatie uitgaande van somatische cellen van volwassen individuen praktisch moeilijk haalbaar, daar waar de transplantatie van kernen van embryonale cellen perfect mogelijk is.

## SUMMARY

Since several years, research efforts have been focused towards improving the reproductive potential of domestic animals. The authors present a review of different technics in particular the superovulation and priming, embryo micromanipulation and clonage. The technic of superovulation allows an increase of the total number of the offspring by an increase of the ovocytes total number. Different FSH injections at the end of the cycle, preceded by small FSH quantity at the begining of the cycle, procure a great number of mature follicles available for reproduction. Micromanipulation allows a multiplication by sectioning the embryo in two or more segments. Isolated blastmeres can also be used but it was observed that those cells very rapidly loose their differentiation potential. Clonage allows the reproduction of an animal from only one of his own cells. The nucleus of this cell is extracted and reimplanted in an enucleated ovocyte. Meanwhile from a practical point of vue, this technic is, at present, only possible using a stem cell and not using a mature somatic cell.

REFERENCES

- J.F. BECKERS, 1987. *Theriogenology* 27,213.
- J.F. BECKERS, P. WOUTERS-BALLMAN, I. DONNAY, M. DEMOUSTIER, K. TOUATI, P. VAN DER ZWALMEN, A. MASSIP and F. ECTORS;1987. Induction of superovulation in cattle. Réunion scientifique de l'association Européenne de transfert embryonnaire. Lyon.
- R. BOUTERS, I. MOYAERT, M. CORYN, J. SPINCEMAILLE and M. VAN DEPLASSCHE, 1980. *Theriogenology* 14,207-216.
- R.W. BRIGGS et T.J. KING 1953. *J. Exptl. Zool.*, 122, 485.
- J. DERIVAUX et F. ECTORS, 1986. Reproduction chez les animaux domestiques. Edité par CABAY, Louvain La Neuve.
- D. DHONDT, R. BOUTERS, J. SPINCEMAILLE, M. CORYN et M. VANDEPLASSCHE. 1978. *Theriogenology* 9,(6), 529-534.
- F.J. ECTORS, P. VAN DER ZWALMEN, K. TOUATI, J.F. BECKERS and F. ECTORS, 1988. *Ann. Méd.* 132,517-519.
- F.J. ECTORS, P. VAN DER ZWALMEN, K. TOUATI, J.F. BECKERS and F. ECTORS, 1989. *Theriogenology*, 31, N°1, 188.
- N.L. FIRST, J.J. PARISH, 1987. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 34, 151-165.
- J.B. ILLMENSEE et P.E. HOPPE, 1981. *Cell*, 23,9-18
- J. KUBIAK, A.K. TARKOWSKI 1985. *Exp. Cell. Res.*, 561-565.
- A. MASSIP, P. VAN DER ZWALMEN et F. ECTORS, 1988. *Ann. Méd. Vét.* 132, 483-487.
- Y. MENEZO, 1976. *C.R. Acad. Sci. Paris. Série D.* 1967-1970.

- I. MOYAERT, R. BOUTERS, O.T. SCHÖNHERR, A.T.M. WILDERBEEK, A. COERT, M. CORYN, M. VANDEPLASSCHE, 1985. *Theriogenology* 21 (1), 210.
- M.J. O'BRIEN, E.S. CRISTER and N.L. FIRST, 1984. *Theriogenology* 22,601-609
- J.P. OZIL, 1982. Duplication de l'embryon bovin pour l'obtention des jumeaux monozygotes. Mémoire DESS. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).
- J.M. ROBL, B. GILLIGAN, E.S. CRISTER, N.L. FIRST, 1986. *Biology of Reproduction* 34,733-739
- J.M. ROBL, R. PRATHER, W. EYESTONE, W. BARNES, D. NORTHEY, B. GILLIGAN and N.L. FIRST, 1986. *Theriogenology* 25,189.
- G.E. SEIGEL, 1982. Microsurgery and micromanipulation of the mammalian embryo. C.R. du IIe Congr. Intern. "Le transfert d'embryons chez les mammifères" (Annecy, 20-22 septembre.) Ed. Ch. Mérieux et M. Bonneau, pp. 115-122.
- A. STEINBERGER, D.N. WARD, 1988. Inhibin. Chap. 15 In : *The physiology of reproduction*. Edited by E. KNOBIL and J. NEILL. Raven Press. New York.
- C. THIBAULT, M-C. LEVASSEUR, 1979. La fonction ovarienne chez les mammifères. *Actualités scientifiques et agronomiques (INRA)*, Ed. Masson. 102p.
- C. THIBAULT, 1985. *Ann. Biol. Clin.* 43,7-16
- C. THIBAULT, D. SZOLLOSI, M. GERARD, 1987. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 865-896.
- K. TOUATI, P.VAN DER ZWALMEN, F.J. ECTORS, J.F. BECKERS and F. ECTORS, 1989. *Theriogenology* 31,269.
- Y. TSUNODA, Y. KATO and Y. SHIODA, 1987. *Gamete Research*, 17,15-20.
- S.M. WILLADSEN, 1979. *Nature*, 277, 298-300.

S.M. WILLADSEN, 1981. J. Embryol. Exp. Morph., 65, 165-172.

S.M. WILLADSEN, C.B. FEHILLY, 1983. The developmental potential and regulatory capacity of blastomeres from 2-, 4-, and 8-cell sheep embryos. In : Beier, H.M. and H.R. Lindner, eds, Fertilization of the Human Egg In Vitro-Biological-Basis and Clinical Applications, Springer, Verlag, Berlin.

S.M. WILLADSEN, 1986. Nature, 320, 63-65.