

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Application de l'échographie à la ponction des follicules ovariens

HANZEN CH., GOFFIN L.

Université de Liège – Faculté de Médecine Vétérinaire
Service d'Obstétrique et de Pathologie de la Reproduction
B41 Sart Tilman, 4000 Liège

RESUME. A travers une vaste revue de la littérature, les auteurs ont effectué une synthèse relative aux aspects techniques de la ponction échoguidée des follicules ovariens dans l'espèce bovine, à leurs résultats potentiels et aux facteurs influençant ces derniers. La technique permet la récolte d'en moyenne un ovocyte dans 57 % des cas de follicules ponctionnés. Trois à dix ovocytes sont ainsi récupérés au cours de chaque séance de ponction. En moyenne quatre ovocytes sur cinq seront mis en maturation. Parmi ceux-ci, 50% seront fécondés et 15 % atteindront le stade de blastocyste ou de morula. La détermination plus précise de critères permettant de mieux sélectionner les animaux et les follicules à ponctionner, de même que le recours éventuel à des traitements hormonaux complémentaires tels que l'hormone de croissance, seraient de nature à améliorer les résultats jusqu'ici obtenus et à limiter les grandes variations individuelles observées. La technique présente divers avantages. Outre aux animaux non-gestants répondant ou non aux traitements classiques de superovulation, elle peut être appliquée également à des animaux gestants et prépubères pendant des périodes de plusieurs mois. Les conséquences ovariennes et sur la fertilité ultérieure sont limitées. De plus, elle permet de prélever des liquides fœtaux. Enfin, elle peut également être appliquée à d'autres espèces animales telles la jument ou les petits ruminants.

INTRODUCTION GENERALE

Depuis de nombreuses années déjà, l'attention des généticiens s'est focalisée sur la sélection tant en qualité qu'en quantité de vaches génétiquement supérieures. Par ailleurs, les impératifs économiques de l'élevage bovin obligent davantage que par le passé les éleveurs à optimiser le potentiel de production de leur troupeau, notamment par une réduction de l'intervalle entre vêlages ou par une augmentation du nombre de veaux produits annuellement par ces mêmes vaches, sachant que la saillie naturelle ou l'insémination artificielle ne permettent la production dans le meilleur des cas que d'un seul veau par an et par vache. Ces objectifs génétiques et économiques ont été à la base du développement des biotechnologies de la reproduction telles que MOET ou la fécondation in vitro.

La méthode dite MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) implique le traitement des animaux avec des hormones gonadotrophiques (PMSG, FSH). Ces traitements de superovulation ont ainsi permis d'augmenter de 1 à 10 le nombre d'ovules libérés par cycle. C'est en 1951 déjà qu'est né le premier veau obtenu après insémination d'un animal donneur, récupération des embryons et leur transfert à des animaux receveurs (Willet et al. 1951). Répétable en moyenne cinq fois par an et par vache, cette procédure se traduit actuellement en pratique par l'obtention annuelle de 25 embryons transférables (Saugmande et al. 1984, Hasler 1992). Elle n'est cependant pas exempte d'inconvénients puisqu'en effet, elle allonge de deux mois environ le délai nécessaire à l'obtention d'une gestation et peut s'accompagner, surtout si elle est répétée chez le

même animal, de réactions iatrogènes ou de kystes ovariens voire d'infections utérines (Bak et al. 1989). Estimée à 100.000 ovocytes, la réserve ovocytaire ne conduit en fait à la production moyenne que d'une centaine d'embryons sur la vie d'un animal soumis à des traitements de superovulation et récolte d'embryons. Il existe donc un gaspillage énorme du potentiel génétique femelle susceptible d'être mis à profit pour la production d'embryons. C'est pourquoi furent mises au point des techniques de récupération d'ovocytes et des méthodes de fécondation in vitro. Celles-ci apparaissent d'autant plus justifiées que différentes recherches sont venues confirmer la continuité du processus de croissance folliculaire sous forme de vagues tant chez les animaux gestants que non-gestants (Savio et al. 1988, Sirois et Fortune 1988, Bergfeldt et al. 1991).

Le premier veau né après maturation in vitro (MIV), fécondation in vitro (FIV) et transfert non chirurgical de l'embryon ainsi obtenu est né en 1981 (Brackett et al. 1982). C'est cependant au cours des années suivantes que se développe la fécondation in vitro d'ovocytes prélevés sur des ovaires obtenus après abattage des animaux (Lu et al. 1987, Xu et al. 1987, Goto et al. 1988, Eystone et First 1989, Bavister et al. 1992, Greve et al. 1993), les ovocytes étant récupérés soit par aspiration du liquide folliculaire, par section de l'ovaire en tranches ou par dissection (First et Parrish 1987, Leibfried-Rutledge et al. 1987). Cette méthode de collecte des ovocytes est encore largement utilisée dans le cadre de recherches fondamentales sur la fécondation in vitro ou plus occasionnellement dans le cas d'animaux réformés pour des raisons sanitaires ou abattus d'urgence (Xu et al. 1992, Van Soom et al. 1994). Elle permet en moyenne l'obtention de 25 à 30 % d'embryons transférables (Lu et Polge 1992, Brackett et Zuelke 1993, Carolan et al. 1994, Gibbons et al. 1995). Irréversible, elle n'est par ailleurs pas exempte de difficultés liées non seulement à l'état sanitaire ou au statut génétique de l'animal donneur prélevé à l'abattoir mais également à la méthode de prélèvement qui interrompt de manière brutale et parfois prolongée les mécanismes physiologiques et biochimiques présidant au développement ovocytaire.

Le caractère irréversible du prélèvement in vitro et son intérêt génétique limité ont conduit à la mise au point de méthodes laparoscopiques ou échographiques offrant la possibilité d'un prélèvement d'ovocytes in vivo.

La laparoscopie ventrale (Laurencik et al. 1991, Armstrong et al. 1991), paralombaire (Lambert et al. 1983, Sirard et Lambert 1985, Lambert et al. 1986, Sirard et Lambert 1986, Laurencik et al. 1991, Fayrer-Hosken et Caudle 1991) ou transvaginale (Stubbings et al. 1988, Armstrong et al. 1991, Reichenbach et al. 1993, Reichenbach et al. 1994) a été expérimentée dans l'espèce bovine. Elle est applicable de manière répétée sur le même individu et n'en-

traîne qu'occasionnellement des complications péritonéales telles que des adhérences (Lambert et al. 1983). Son utilisation hebdomadaire voire bihebdomadaire ne peut selon certains auteurs être prolongée plus de 5 semaines (Reichenbach et al. 1994). Bien qu'elle permette chez la vache d'obtenir un pourcentage de récupération des ovocytes compris entre 50 et 84 % (Sirard et Lambert 1985, Stubbings et al. 1988, Reichenbach et al. 1993, Reichenbach et al. 1994), elle a pour des raisons pratiques telles que la mise à jeun de l'animal, la nécessité d'induire une distension abdominale, l'allongement de l'intervalle entre deux ponctions...), été progressivement remplacée par des méthodes de ponction ayant recours à l'échographie.

D'abord utilisée par voie transcutanée au niveau de la région sacroischiatique (Callesen et al. 1987), la ponction échoguidée des follicules ovariens (OPU: Ovum Pick-Up) est communément utilisée à l'heure actuelle par voie transvaginale chez la vache (Pieterse et al. 1988, Kruip et al. 1990, Vos et al. 1990, Kruip et al. 1991, Pieterse et al. 1991a, Pieterse et al. 1991b, Sprecher et Kaneene 1992, Armstrong et al. 1992, Ryan et al. 1993, Vos et al. 1994, Brogliatti et Adams 1996).

Le présent travail a pour but de faire une mise au point des potentialités de la méthode dans les différentes espèces animales mais aussi de ses facteurs limitants inhérents à ses aspects techniques et à la physiologie folliculaire.

LA PONCTION ECHOGUIDEE: ASPECTS TECHNIQUES

Le matériel

Simple en apparence, la méthode de ponction échoguidée suppose néanmoins la parfaite maîtrise de divers aspects pratiques parfois différents selon les équipes.

Le matériel échographique

Il se caractérise tout à la fois par la configuration et la fréquence de la sonde utilisée. Habituellement sectorielle, la sonde peut néanmoins être semi-courbe (finger type) ou li-

néaire. Sa fréquence s'échelonne entre 3.5 et 7.5 MHz (Pieterse et al. 1988, Van der schans et al. 1991, Pieterse et al. 1991b, Kruip et al. 1994, Bergfeldt et al. 1994, Gibbons et al. 1994). Cependant, parce qu'elle offre une meilleure résolution, une sonde de 7.5 MHz s'avère optimale pour visualiser la population folliculaire ponctionnable. Déterminée in vitro par échographie, celle-ci se compose de follicules de diamètre compris entre 2 et 4 mm (92 %), entre 5 et 10 mm (6 %) et supérieur à 10 mm (2 %) (Fry et al. 1993). Comparée à d'autres méthodes, l'échographie sous-évalue cependant le nombre de follicules ponctionnables réellement présents sur l'ovaire. Ainsi, comparant la détermination antemortem par échographie et postmortem par dissection du nombre de follicules présents sur les ovaires, Gong démontre que l'échographie n'identifie que 19 et 44 % des follicules de taille respectivement inférieure à 5 mm et comprise entre 5 et 10 mm (Gong et al. 1993). Cette observation fut confirmée à l'occasion d'une autre étude au cours de laquelle un follicule sur trois (34 %) détecté par dissection fut identifié par échographie (Pieterse et al. 1990).

Les aiguilles de ponction

Selon les équipes, quatre types d'aiguilles de ponction sont utilisées. Le premier type d'aiguille est constitué d'une seule pièce d'une longueur de 50 à 60 cm, biseautée à son extrémité. Son utilisation répétée entraîne l'émoussement. Quoique possible, un nouvel aiguisage de ces aiguilles ne leur restitue cependant pas leur tranchant initial. Elles sont par ailleurs fort coûteuses (Pieterse et al. 1988, Simon et al. 1993, Gibbons et al. 1994, Looney et al. 1994). Une amélioration a été apportée par l'utilisation d'aiguilles d'injection jetables fixées par collage ou soudure à une tubulure métallique d'un diamètre équivalent. Une réduction de l'espace mort entraîné par ces deux premiers types d'aiguilles a été obtenu en raccordant l'aiguille jetable à une tubulure en silicone passant au travers du tube métallique (Rath 1993, Bols et al. 1995). Le dernier type d'aiguille

comporte un double conduit. Cette adaptation technique offre la possibilité d'injecter du liquide dans la cavité folliculaire (Fry et al 1993).

Le tranchant et l'échogénicité sont deux caractéristiques essentielles des aiguilles de ponction. Une attention particulière sera également réservée à la nature du matériel (métal, inox), au biseau (25° à 45°), à la longueur totale (40 à 60 cm) ainsi qu'aux diamètres interne (0,6 à 1,2 mm) et externe (0,8 à 1,6 mm) des aiguilles de ponction. Le diamètre interne (0,6 à 1,2 mm) ne semble pas influencer le taux de récupération des ovocytes (Baltussen et al. 1990). Sa réduction offre l'avantage de pouvoir ponctionner les follicules de petit diamètre (2 mm). La réduction du diamètre évite par ailleurs la contamination éventuelle des tubes de récolte par du sang mais augmente le risque de lésion du cumulus oophorus des ovocytes lors de l'aspiration et par conséquent leur potentiel de fécondation future. A l'inverse, l'augmentation du diamètre externe entraîne plus de lésions de la paroi vaginale, de l'ovaire et des follicules mais contribue à augmenter le pourcentage de récupération des ovocytes (Fry 1993).

Le rinçage de la cavité folliculaire

Réalisé au moyen de PBS (Phosphate Buffered Saline), il augmente (Fry et al. 1994) ou non (Baltussen et al. 1990) chez la vache, le taux de récupération des ovocytes. Chez la jument (Vogelsang et al. 1988), son effet favorable a été reconnu. Il nécessite cependant l'augmentation du diamètre de l'aiguille et contribue par ailleurs à allonger le temps nécessaire à la ponction (Pieterse et al. 1988). Réalisé sous trop forte pression, le rinçage de la cavité folliculaire peut entraîner la rupture et la perte de l'ovocyte (Pieterse et al. 1988). Certains systèmes sont équipés d'une tubulure de rinçage permanent de l'aiguille d'aspiration (Simon et al. 1993). Cette adaptation évite l'obturation du canal de l'aiguille par de petits caillots de sang, phénomène plus fréquemment observé si l'ovaire est porteur d'un corps jaune fonctionnel.

Le dépôt par trempage d'un film de BSA (Bovine Serum Albumine) sur la face interne des aiguilles ainsi que des tubulures de connexion ne semble pas améliorer le taux de récupération des ovocytes (Baltussen et al 1990).

Les tubulures de connexion

Elles doivent être conçues de manière à éviter autant que possible les turbulences susceptibles de léser les ovocytes ou de réduire le pourcentage de récupération. Leur diamètre est habituellement supérieur au diamètre interne de l'aiguille de ponction et leur rigidité assure une résistance au vide d'aspiration appliqué par la pompe aspirante. Elles sont au préalable rincées au moyen du liquide de récolte (PBS).

La pression d'aspiration

Elle constitue un des principaux facteurs influençant le taux de récupération des ovocytes. Habituellement exprimée en mm de Hg, la pression d'aspiration réellement observée à l'extrémité de l'aiguille est comprise selon les auteurs entre 40 et 150 mm de Hg (Bungartz et al. 1995, Van der Schans et al. 1991, Lindsey et al. 1994, Kruip et al. 1994, Fry et al. 1993, Looney et al. 1994, Meintjes et al. 1995, Brogliatti et Adams 1996, Gibbons et al. 1994, 1995, Bols et al. 1995, Moyo et Dobson 1995). Elle est néanmoins dépendante de différents facteurs tels que le diamètre et la longueur de l'aiguille ou le système de ponction utilisé. Cette pression d'aspiration est parfois exprimée en terme de ml d'eau aspiré en une minute par la pompe d'aspiration. Ainsi, une pression d'aspiration de 110 mm Hg permet d'aspirer respectivement 37 et 46 ml d'eau par minute au moyen d'aiguilles de 19 et 18 G (Bols et al. 1994). Des pressions permettant l'aspiration de 4 à 60 ml d'eau par minute sont habituellement recommandées (Pieterse et al. 1991b, Rath 1993, Bols et al. 1994, Bols et al. 1995, Bungartz et al. 1995, Looney et al. 1995, Brogliatti et Adams 1996, Pieterse et al. 1988, Scott et al. 1994, Vos et al. 1994). La pression d'aspiration doit être à la fois constante et non excessive. Les turbulences induites au niveau des

points de jonction entre l'aiguille et le système tubulaire par des variations de la pression d'aspiration ou l'augmentation de la pression d'aspiration qui accélère la progression des ovocytes peuvent contribuer à la perte de cellules de la granuleuse. A l'inverse, une pression d'aspiration trop faible réduira le taux de récupération des ovocytes. Une étude plus spécifique réalisée in vitro a démontré que l'augmentation de la pression d'aspiration de 25 à 100 mmHg contribue à accroître le taux de récupération des ovocytes. Cependant le pourcentage d'ovocytes utilisables pour la fécondation est optimal pour des pressions comprises entre 25 et 50 mm Hg (Fry et al. 1993). Semblable observation a été réalisée par d'autres auteurs. Indépendamment du diamètre de l'aiguille utilisée, une augmentation de la pression d'aspiration de 20 à 56 ml par minute augmente le nombre d'ovocytes dénudés et diminue celui d'ovocytes compacts (Bols et al. 1994).

Le milieu de récolte

C'est un milieu tamponné au phosphate (PBS) pouvant ou non contenir du sérum fœtal ou des antibiotiques. L'addition d'héparine (2 à 5 UI/ml) contribue à limiter la coagulation dans les tubulures et le tube de récolte (Simon et al 1993, Kruip et al 1994, Meintjes et al. 1995). Cependant, le contact prolongé (plus de 60 minutes) des ovocytes avec ce milieu est de nature à en réduire le potentiel de développement. Il convient donc de les placer dès que possible dans un milieu non hépariné.

La méthode de ponction intravaginale

La position anatomique des ovaires de la vache, situés au bord antérieur du bassin à une largeur de main du col de l'utérus facilite l'utilisation de la méthode dans cette espèce. L'animal placé dans un travail de contention est éventuellement tranquilisé par une injection d'hydrochloride de détomidine (1 mg/100 kg) (Domosedan RD) ou de xylazine (Rompun RD). Une anesthésie locale (épidurale) permet de réduire les efforts expulsifs de l'animal. Une relaxation plus complète du rectum peut être

obtenue par une injection de 4 mg / 100 kg d'hyoscine-N-butylbromide (Buscopan RD).

Les matières fécales sont évacuées du rectum. Au besoin, la vessie est vidée au moyen d'une sonde de Foley. La région vulvaire est lavée et désinfectée pour éviter tout risque de contamination des ovocytes prélevés. La sonde échographique est guidée au travers de la cavité vaginale jusqu'à son extrémité antérieure paracervicale au moyen d'un guide métallique (Figure 1). L'ovaire manipulé par voie transrectale est amené sur l'extrémité de la sonde échographique. Les follicules présents sur l'ovaire apparaissent sur l'écran de l'échographe sous la forme de zones noires anéchogènes. Le déplacement de l'ovaire et/ou de la sonde permet d'ajuster la position du follicule à ponctionner sur le trajet de l'aiguille de ponction identifié par une ligne sur l'écran de l'échographe. L'aiguille est poussée vers l'avant de manière à traverser successivement la paroi vaginale puis celle du follicule. Une fois la pointe de l'aiguille identifiée aux abords de la cavité folliculaire, l'aspiration est déclenchée: elle se traduit par la disparition progressive de la zone anéchogène folliculaire. Certains auteurs (Pieterse et al. 1988, Scott et al. 1994) ont recommandé de cureter la cavité folliculaire en imprimant des mouvements circulaires à l'aiguille de ponction. Après la ponction, le contenu de chaque tube de récolte est maintenu à une température de 35 à 38°C. Il est filtré et examiné pour isoler et mettre en maturation les ovocytes récupérés.

RESULTATS POTENTIELS

Ils sont exprimés par divers paramètres tels que le pourcentage moyen d'ovocytes récupérés par rapport au nombre de follicules ponctionnés, par le nombre moyen d'ovocytes obtenus par session de ponction ou encore par le pourcentage d'embryons obtenus par rapport au nombre d'ovocytes mis en maturation. Les valeurs de ces paramètres dépendent de multiples facteurs susceptibles d'influencer les manipulations réalisées non seulement *in vivo* mais également *in vitro*.

Parmi d'autres, il convient d'insister sur le rôle de l'expérience de l'opérateur, du rythme de prélèvement, de la fréquence de la sonde et donc de son pouvoir de résolution, de l'animal et notamment de son statut génétique et physiologique, des éventuels traitements hormonaux réalisés avant la ponction et d'autres aspects plus techniques déjà évoqués.

Paramètres d'évaluation

Par rapport au nombre de follicules ponctionnés, le pourcentage moyen d'ovocytes récoltés est de 57 % mais varie selon les auteurs entre 19 et 70 % (Pieterse et al. 1988, Baltussen et al. 1990, Van der Schans et al. 1991, Pieterse et al. 1991b, Kruip et al. 1991, Simon et al. 1993, Kruip et al. 1993, Looney et al. 1994, Scott et al. 1994, Roelofsen-Vendrig et al. 1994, Vos et al. 1994, Bungartz et al. 1995, Lansbergen et al. 1995, Moyo et Dobson 1995, Donnay et al. 1996) (Tableau 1).

Selon les auteurs, le nombre moyen d'ovocytes récupérés par session de ponction échoguidée *in vivo* est compris entre 2.8 et 9.7 (Van der Schans et al. 1991, Gibbons et al. 1994, Kruip et al. 1994, Looney et al. 1994, 1994, Gibbons et al. 1995, Bungartz et al. 1995, Donnay et al. 1996). Appliquée à 200 vaches laitières et à viande, la technique a per-

mis de récupérer en moyenne 6.3 ovocytes par vache dans 98 % des 1006 séances de ponction effectuées (Looney et al. 1994). Plusieurs auteurs s'accordent à dire qu'il existe davantage de variations du nombre de follicules ponctionnés (8 à 20) et d'ovocytes récoltés (4 à 11) entre animaux qu'au cours du temps pour un animal donné (Kruip et al. 1994, Gibbons et al. 1995).

La ponction écho-guidée des follicules ne constitue qu'une étape à l'obtention d'embryons. Les ovocytes doivent en effet être mis en maturation puis être fécondés. En moyenne, 82 % des ovocytes récupérés peuvent être mis en maturation (Tableau 2). Selon les auteurs, ce pourcentage est compris entre 41 et 100 %. (Kruip et al. 1991, Kruip et al. 1993, Kruip et al. 1994, Looney et al. 1994, Bungartz et al. 1995, Meintjes et al. 1995). Il en résulte la maturation d'un ovocyte sur deux en moyenne (49 %) (Simon et al. 1993, Kruip et al. 1994, Looney et al. 1994, Bungartz et al. 1995, Bols et al. 1995, Meintjes et al. 1995) (Tableau 2).

En moyenne, 15 % (3 à 41 % selon les auteurs) des ovocytes mis en maturation atteignent le stade de *morula* ou de *blastocyste* (Kruip et al. 1991, Kruip et al. 1993, Gibbons et al. 1994, Looney et al. 1994, Kruip

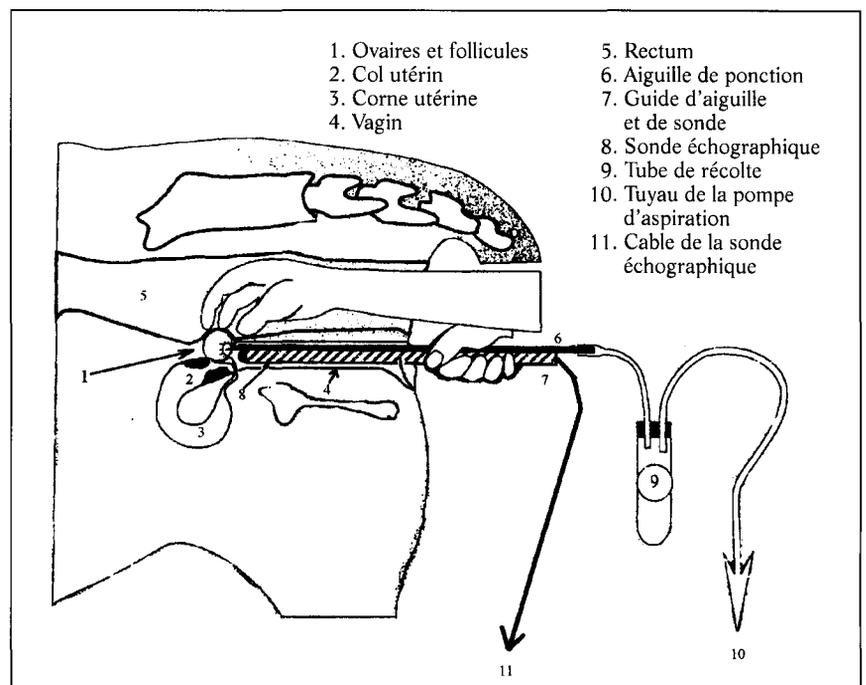


Figure 1

Schéma de la ponction échoguidée des follicules ovariens dans l'espèce bovine.

et al. 1994, Bols et al. 1995, Gibbons et al. 1995, Bungartz et al. 1995) (Tableau 2). Kruip estime à 2.1 le nombre d'embryons produits par animal et par semaine sur base d'une ponction bihebdomadaire, ce qui représente un nombre annuel moyen 4 fois supérieur à celui autorisé par la superovulation (Kruip et al. 1994). D'une expérience réalisée au moyen de vaches infertiles et après transfert de 813 embryons à des receveuses, Looney obtient 325 gestations soit respectivement 5.1 % de gestations par rapport au nombre de follicules

ponctionnés et 39.9 % par rapport au nombre de morulas ou blastocystes obtenus (Looney et al. 1994). D'une expérience comparée menée dans le même laboratoire, il ressort que respectivement 30 et 41 % d'embryons ont été obtenus après fécondation d'ovocytes récoltés in vitro et in vivo (Gibbons et al. 1995).

Facteurs susceptibles d'influencer les résultats

Différentes fréquences de ponction ont été évaluées. Réalisée en début

(J3-J4), au milieu (J9-J10) et en fin de cycle (J15-J16), la technique permet de ponctionner en moyenne 13 follicules par cycle. Le nombre moyen de follicules ponctionnés en début de cycle (4.9) est plus élevé que celui obtenu au milieu (3.4) ou en fin (3.9) de cycle, le taux de récupération des ovocytes étant sensiblement le même et compris entre 50 et 53 % (Pieterse et al. 1991b).

Par rapport à une ponction hebdomadaire, la ponction bihebdomadaire ne réduit ni le nombre de follicules ponctionnables de diamètre supérieur à 2 mm, ni le nombre d'ovocytes récupérés par ponction (Van der Schans et al. 1991, Gibbons et al. 1994, Kruip et al. 1994). Elle offrirait au contraire l'avantage de pouvoir ponctionner une population folliculaire relativement plus homogène. Selon certains auteurs, par rapport à une ponction réalisée toutes les 96 heures, une ponction réalisée toutes les 48 heures augmente le pourcentage d'ovocytes récupérés et celui d'ovocytes morphologiquement intacts (52.6 vs 38.2). Cependant, ce rythme de ponction s'accompagne d'une diminution de la qualité des ovocytes au cours des 2 mois de ponction (Simon et al. 1993). Réalisée par laparoscopie transvaginale, la ponction bihebdomadaire permet par rapport à une ponction hebdomadaire de doubler le nombre d'ovocytes récoltés par semaine (12.2 vs 5.2) (Reichenbach et al. 1994).

L'effet d'une stimulation de la croissance folliculaire au moyen de PMSG ou de FSH a été étudié. Bien qu'elle s'accompagne d'une augmentation du nombre de follicules ponctionnables, elle n'augmente pas le nombre d'ovocytes récoltés (Pieterse et al. 1992, Walton et al. 1993, Bungartz et al. 1995). Cependant, selon Looney et al. (1994), un traitement au moyen de FSH serait plus bénéfique s'il était appliqué à des animaux subfertiles. Elle est par ailleurs sans effet sur le nombre d'ovocytes fécondés ou le nombre d'embryons obtenus (Looney et al. 1994, Bungartz et al. 1995). Ces observations sont sans doute liées au fait que le pourcentage de récupération des ovocytes diminue lorsque le

Tableau 1
Pourcentage de récupération des ovocytes après ponction échoguidée transvaginale chez la vache

| MHz | N follicules | N ovocytes récupérés | % | Diamètre follicule (mm) | Références |
|--------------|--------------|----------------------|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| 7.5/6 | 91 | 17 | 19 | >= 3 | Scott et al. 1994 |
| 7.5 | 115 | 29 | 25 | > 2 | Van der Schans et al. 1991 |
| 5 | 197 | 53 | 27 | NP | Pieterse et al. 1988 |
| 7.5 | 415 | 116 | 28 | > 9 | Vos et al. 1994 |
| 6.5 | 1289 | 461 | 36 | NP | Simon et al. 1993 |
| 7.5 | 291 | 122 | 42 | NP | Bols et al. 1995 |
| 5 | 1391 | 625 | 45 | >= 2 | Meintjes et al. 1995 |
| 7.5 | 124 | 60 | 48 | >= 5 | Moyo et Dobson 1995 |
| 7.5 | 443 | 220 | 50 | NP | Baltussen et al. 1990 |
| 7.5 | 206 | 103 | 50 | >= 3 | Kruip et al. 1991 |
| 7.5 | 723 | 376 | 52 | >= 3 | Pieterse et al. 1991b |
| NP | 7970 | 4303 | 54 | >= 2 | Kruip et al. 1993 |
| 6.5 | 3042 | 1677 | 55 | >= 2 | Roelofs-Vendrig et al. 1994 |
| NP | 1014 | 558 | 55 | NP | Lansbergen et al. 1995 |
| 6.5 | 641 | 371 | 58 | >= 2 | Donnay et al. 1996 |
| 6.5 | 937 | 618 | 66 | > 2 | Bungartz et al. 1995 |
| 5 | 9120 | 6344 | 70 | NP | Looney et al. 1994 |
| Total | 28009 | 16053 | 57 | | |

NP: Non Précisé

Tableau 2:
Pourcentage de morulas et/u blastocystes obtenus après maturation et fécondation in vitro d'ovocytes récupérés par ponction échoguidée chez la vache

| OR* | OM* | | OMAT* | | EMB* | | Références |
|------|------|-----------|-------|-----------|------|-----------|----------------------|
| n | n | % | n | % | n | % | |
| | 127 | | 35 | 28 | | | Simon et al. 1993 |
| 625 | 256 | 41 | 94 | 37 | | | Meintjes et al. 1994 |
| 618 | 344 | 56 | 196 | 57 | 11 | 3.1 | Bungartz et al. 1995 |
| 6344 | 5986 | 94 | 2677 | 45 | 813 | 14 | Looney et al. 1994 |
| 4294 | 3124 | 73 | | | 515 | 16 | Kruip et al. 1993 |
| | 176 | | | | 29 | 16 | Gibbons et al. 1994 |
| 1677 | 1366 | 81 | 944 | 69 | 218 | 16 | Kruip et al. 1994 |
| 104 | 104 | 100 | | | 18 | 17 | Kruip et al. 1991 |
| 122 | 116 | | 80 | 69 | 33 | 28 | Bols et al. 1995 |
| 228 | 120 | | | | 49 | 41 | Gibbons et al. 1995 |
| | | 82 | | 49 | | 15 | Moyenne (%) |

* OR: Ovocytes récupérés
 OM: Ovocytes mis en maturation (le pourcentage est calculé par rapport au nombre d'ovocytes récupérés)
 OMAT: Ovocytes ayant terminé leur maturation (le pourcentage est calculé par rapport au nombre d'ovocytes mis en maturation)
 EMB: Embryons transférables (morulas et/ou blastocystes) (le pourcentage est calculé par rapport au nombre d'ovocytes mis en maturation)

diamètre du follicule ponctionné augmente (Pieterse et al. 1991a). Ainsi des taux de récupération de 58, 53 et 37 % ont été obtenus après ponction de follicules de diamètre respectivement compris entre 3 et 5 mm, 6 et 10 mm ou supérieur à 10 mm (Pieterse et al. 1991b). De même, Van der Schans constate qu'après un traitement au moyen de PMSG, 91.4 % des ovocytes récoltés proviennent de follicules de diamètre compris entre 2 et 5 mm (Van der Schans et al. 1991). Cette observation a été confirmée après ponction in vitro d'ovaires prélevés à l'abattoir. Des taux de récupération de 53 %, 43 % et 47 % ont été obtenus après ponction de follicules de diamètre respectivement compris entre 2 et 4 mm, 5 et 10 mm ou supérieur à 10 mm (Fry et al. 1993). La cause peut en être trouvée dans le fait qu'une fois ponctionné, la paroi du follicule tend à s'affaisser et à former des replis susceptibles d'emprisonner l'ovocyte (Baltussen et al. 1990) ou de coiffer l'extrémité de l'aiguille ce qui supposerait l'utilisation d'une pression d'aspiration plus élevée lors de ponction de follicules de plus grand diamètre (Vos et al. 1994). Après un traitement de superovulation, le pourcentage de récupération des ovocytes est d'autant plus élevé que la ponction est réalisée tardivement après le pic de l'hormone lutéotrope (LH) (Vos et al. 1994, Stubbings et al. 1990, Callesen et al. 1987). Cette observation a été imputée à la réduction du degré d'adhésion du cumulus proliger à la paroi folliculaire dans les follicules prêts à ovuler (Vos et al. 1994) ou en voie d'atrésie (Pieterse et al. 1988).

D'autres traitements ont été évalués. Ainsi, lors de ponction hebdomadaire, l'injection d'une prostaglandine en cas de présence d'un corps jaune, permet l'obtention d'un plus grand nombre d'ovocytes mais réduit leur qualité. Le nombre d'ovocytes reste néanmoins inférieur à celui obtenu lors de ponctions bihebdomadaires (Reichenbach et al. 1994). La suppression de l'effet inhibiteur du follicule dominant par une vaccination contre l'inhibine, ne modifie pas le nombre d'ovocytes obtenus (Fry et al. 1994). Il est possible que l'hormone de croissance

(GH: growth hormone) connue pour augmenter le nombre d'embryons transférables après un traitement de superovulation (Gong et al. 1996) puisse offrir de nouvelles perspectives dans le cadre de la fécondation in vitro d'ovocytes prélevés par ponction échoguidée (Bols et al. 1997).

L'effet du *stade de reproduction* a également été étudié. Comparant des génisses et des vaches en lactation, tarées ou gestantes, Bungartz observe un nombre moyen de follicules ponctionnables significativement plus élevé chez les vaches en lactation (10.6) et tarées (9.3) que chez les vaches gestantes (7.3) ou les génisses (8.1). Le nombre d'ovocytes récoltés n'est cependant pas significativement différent (5.7 à 7.2). Le pourcentage d'ovocytes récoltés est significativement plus élevé chez les vaches tarées (74.4 vs 66.3 à 69.9). Enfin, le pourcentage d'embryons obtenus n'est pas significativement différent (11.9 à 22.7 %) entre les quatre groupes comprenant il est vrai un nombre limité d'animaux (4 à 6) (Bungartz et al. 1995).

La *qualité des ovocytes ponctionnés* est un facteur déterminant du pourcentage d'embryons obtenus (Shioya et al. 1988). Divers critères morphologiques (Leibfreid et First 1979, Simonetti et al. 1985, De Loos et al. 1989, Kruip et al. 1991) ou hormonaux (Callensen et al. 1986, Goff et al. 1986, Maurer et al. 1987, Stubbings et al. 1990) d'évaluation de la qualité des ovocytes ont été proposés. Celle-ci dépend entre autres choses de celle des follicules dont ils proviennent (Kruip et al. 1991). D'une étude réalisée in vitro sur des ovaires prélevés à l'abattoir, il ressort que tant chez les vaches gestantes que non gestantes, le pourcentage d'ovocytes normaux diminue lorsque la taille du follicule dont ils sont issus augmente (Dominguez 1995). La cause doit en être trouvée dans l'augmentation de la probabilité d'atrésie avec la taille du follicule (Ko et al. 1991, Skyer et al. 1987). Ce facteur est très certainement à prendre en considération puisque 85 % des follicules présents sur les ovaires sont plus ou moins atrétiques (Kruip 1982). Etudiant la qualité des ovo-

cytes provenant de follicules de diamètre supérieur à 8 mm, Stubbings constate que les ovocytes matures proviennent le plus souvent de follicules dont le volume est d'au moins 0.3 ml (10 mm de diamètre moyen) et dont les concentrations en progestérone, œstrogènes et testostérone sont respectivement supérieures à 100 ng, comprises entre 5 et 60 ng et entre 5 et 45 ng par ml (Stubbings et al. 1990).

La concentration folliculaire en progestérone est significativement augmentée après le pic de LH chez les animaux superovulés (Callesen et al. 1986, Goff et al. 1986, Maurer et al. 1987). A l'inverse, la concentration en œstrogènes semble être indépendante de la taille du follicule (Callesen et al. 1986, Stubbings et al. 1990). Elle serait néanmoins plus élevée chez les animaux n'ayant pas manifesté de pic de LH (Goff et al. 1986, Stubbings et al. 1990). Les concentrations en androgènes suivent une évolution parallèle à celle des œstrogènes confirmant le rôle de substrat joué par les premiers à l'encontre des seconds. Selon les auteurs, la présence d'un corps jaune réduirait (Moreno et al. 1992), augmenterait (Greer et al. 1992) ou serait sans effet (Dominguez 1995) sur la qualité des ovocytes ou leur capacité à être fécondés et à évoluer jusqu'au stade de morula ou de blastocyste.

Il existe comme pour les traitements de superovulation et la récolte d'embryons in vivo, une *grande variabilité individuelle* dans le nombre d'ovocytes récoltés (Pieterse et al. 1992, Kruip et al. 1994, Lansbergen et al. 1995, Gibbons et al. 1995, Moyo et Dobson 1995, Meintjes et al. 1995, Donnay et al. 1996). On peut y voir en partie l'effet indirect de l'état corporel de l'animal au moment de la ponction qui en cas d'insuffisance réduirait le nombre de follicules de diamètre inférieur à 4 mm et supérieur à 10 mm (Dominguez 1995).

Il faut par ailleurs noter que l'absence de réponse à un traitement de superovulation ne laisse présumer en rien un échec éventuel lors de la ponction de l'animal. En effet, récemment il a été prouvé que le taux de blastocystes transférables obtenus

après ponction de 200 donneuses d'embryons n'ayant plus répondu depuis au moins un an à des traitements de superovulation était comparable à celui obtenu chez des animaux normalement cyclés (Looney et al. 1994). Semblable conclusion a été apportée après application de la technique à des animaux infertiles (Bungartz et al. 1995). Les techniques de superovulation et de ponction échoguidée se complètent donc fort bien pour optimiser la production d'embryons de vaches d'élite.

CONSEQUENCES POSSIBLES

A court terme, les effets de la ponction sur le cycle œstral apparaissent dépendre de sa fréquence. A la différence d'une ponction bihebdomadaire, la ponction hebdomadaire n'interfère pas avec la cyclicité de l'animal (Gibbons et al. 1994). Réalisée trois fois par cycle, la ponction n'en entraîne l'allongement que dans 7 % des cas (Pieterse et al. 1991b). La raison peut en être trouvée dans le fait qu'à la différence de l'électrocautérisation (Villa-Godoy et al. 1985), la ponction folliculaire ne lèse pas les cellules de la granulose et par conséquent n'interfère pas avec les mécanismes hormonaux de la lutéolyse et du développement lutéal même si à la différence de la jument (Carnevale et al., 1987) la lutéinisation du follicule à l'endroit de ponction n'est habituellement pas observée chez la vache (Pieterse et al., 1988, Pieterse et al., 1991 a, b, Bergfelt et al., 1994). Cependant, réalisée à intervalles inférieurs à 5 jours (ponction bi-hebdomadaire), elle s'accompagne d'un état d'œstrus de l'animal pendant la durée de la ponction (Gibbons et al. 1994, Kruip et al. 1994). Par ailleurs, un effet indirect de la ponction sur le rythme de croissance folliculaire n'est pas à exclure. En effet, le nombre de cycles présentant 3 vagues de croissance folliculaire se trouve significativement augmenté après ponction (Pieterse et al. 1991b). De même, parce qu'elle empêche l'émergence du follicule dominant, la ponction bihebdomadaire favoriserait le recrutement d'une population plus homogène de petits follicules (Bungartz et al. 1995).

A moyen terme, après application sur le même animal pendant 5 mois, la ponction bihebdomadaire est sans effet sur la cyclicité ultérieure de l'animal qui par la suite peut encore donner naissance à des veaux (Kruip et al. 1994). Semblable observation a été effectuée après ponction de génisses prépubères (Looney et al. 1995).

Les conséquences sur l'ovaire lui-même sont également mineures puisque seul un épaississement de la capsule ovarienne a été décrit même après 3 à 5 mois de ponctions bihebdomadaires (Pieterse et al. 1991b, Van der Schans et al. 1991, Simon et al. 1993, Kruip et al. 1994, Meintjes et al. 1995). Certains auteurs ont identifié la formation possible d'un hématome au sein des follicules ponctionnés surtout si leur diamètre était égal ou supérieur à 11 mm (Bergfelt et al. 1994).

De manière plus spécifique, la ponction réalisée de manière répétée au cours de l'œstrus provoqué par l'administration d'une prostaglandine à des animaux superovulés, n'induit aucune variation du délai d'apparition du pic de LH (Vos et al. 1994). Cette observation exclut la possibilité d'un effet stressant de la ponction médié par les corticoïdes (Edwards et al. 1987).

AUTRES CHAMPS D'APPLICATIONS POTENTIELS

Bien qu'appliqué en priorité à des animaux cyclés, le prélèvement d'ovocytes a également été réalisé chez des *animaux prépubères* soit par laparoscopie chez des veaux âgés de 3 à 9 semaines (Armstrong et al. 1991, Armstrong et al. 1992, Armstrong et al. 1994) ou par échographie sur des veaux âgés de 6 à 16 semaines (Brogliatti et Adams 1996) ou de 6 à 9 mois (Looney et al. 1995). Il a également été appliqué chez des animaux gestants tant par laparotomie (Ryan et al. 1990, Ryan et al. 1993) que par ponction échoguidée (Ryan et al. 1990, Ryan et al. 1993, Meintjes et al. 1993).

Le prélèvement d'ovocytes à des animaux prépubères offre l'avantage de contribuer à réduire l'intervalle entre

génération et donc d'améliorer le gain génétique annuel. Il pose néanmoins le double problème d'adapter le système de ponction à l'anatomie vaginale de l'animal et de réaliser une ponction sans pouvoir fixer l'ovaire. Moyennant l'adaptation d'une sonde de 5 MHz convexe à usage humain, de diamètre de 2.5 cm et d'une longueur de 39 cm, certains auteurs sont cependant parvenus en plaçant l'animal en position debout ou en décubitus dorsal à prélever des ovocytes avec ou sans stimulation ovarienne préalable. Des essais de fixation des ovaires au moyen d'une cuillère à usage transrectal ou de forceps transvaginaux se sont révélés infructueux. La méthode requiert une expérience certaine mais peut être appliquée aux brebis, chèvres et lamas. Par ailleurs, l'impossibilité de fixer les ovaires suppose l'emploi d'aiguilles particulièrement bien aiguisées. Il est vrai qu'en décubitus dorsal, une pression exercée sur l'abdomen de l'animal contribue à immobiliser les ovaires (Brogliatti et Adams 1996). Il semblerait cependant qu'en l'état actuel des connaissances (Duby et al. 1996), la technique de la FIV (Fécondation In Vitro) doit davantage être réservée aux animaux âgés de plus de 6 mois. En effet, plusieurs différences physiologiques ont à ce jour été observées entre les veaux de moins de 6 mois et les animaux plus âgés. Elles concernent le synchronisme du développement de la population folliculaire, l'apparition des compétences cytoplasmiques et/ou nucléaires des ovocytes, la libération des hormones hypophysaires LH et FSH et la libération du Ca, second messenger impliqué dans le mécanisme de la fertilisation.

Par rapport à un schéma de superovulation et de récolte d'embryons in vivo, la ponction des follicules chez les *animaux gestants* offre l'avantage de ne pas interférer avec l'intervalle entre vêlages. Elle peut être réalisée après une stimulation ovarienne puisqu'il fut démontré que des traitements avec de la FSH (Ryan et al. 1993) ou avec de la PMSG (Casida et al. 1943) n'interfèrent pas avec la longueur de gestation ou la fonction hormonale progestéronique. De fait, après un traitement au moyen de

40 UA (Unite Armour) de FSH, le nombre de follicules ponctionnables (de diamètre supérieur ou égal à 2 mm et d'ovocytes de qualité s'est avéré être équivalent chez des vaches non-gestantes ou gestantes de 60 à 95 jours (Meintjes et al. 1995). Appliquée pendant le 1^{er} trimestre de la gestation, elle ne s'est accompagnée d'aucun risque d'avortement ou de néomortalité (Meintjes et al. 1995).

Bien que la ponction échoguidée soit à l'heure actuelle principalement utilisée en vue de la récupération des ovocytes, cette méthode est susceptible de connaître des *applications cliniques* plus étendues dont les plus importantes à ce jour sont l'étude hormonale des liquides folliculaire (Vos et al. 1994), allantoïdien ou amniotique, l'amélioration de la réponse aux traitements de superovulation, l'optimisation de la régulation du cycle sexuel ou le sexage de l'embryon et du fœtus.

Par rapport à d'autres méthodes de ponction réalisées par laparotomie (Leibo et Rall 1990) ou par la voie transsacrosciatique, transischio-rectale (Eaglesome et Mitchell 1977) ou transvaginale (Sprecher et Kaneene 1992), la ponction échoguidée offre l'avantage de pouvoir prélever de manière répétitive jusqu'au 3^{ème} mois de gestation du liquide allantoïdien ou amniotique dès respectivement le 32^e et le 44^e jour de gestation (Vos et al. 1990) et de réduire les risques de mortalité embryonnaire ou d'avortement que peuvent entraîner ces prélèvements. Il n'est pas illusoire de penser que cette méthode puisse constituer une alternative intéressante au sexage de l'embryon par échographie.

Plusieurs recherches ont identifié le rôle inhibiteur du follicule dominant de chaque vague folliculaire sur la croissance des autres follicules et donc sur la réponse aux traitements de superovulation (Guilbaut et al. 1991, Huhtinen et al. 1992, Bungartz et Niemann 1994). Réalisée

initialement par ovariectomie unilatérale (Staigmiller et al 1982) ou par électrocautérisation (Ko et al 1991), la suppression de l'activité inhibitrice du follicule dominant a par la suite été effectuée par la ponction échoguidée (Bungartz et Niemann 1994), méthode moins invasive et plus répétable que les précédentes. Cette intervention se traduit selon plusieurs auteurs par une augmentation du nombre d'embryons chez des vaches superovulées qui ne répondaient que faiblement aux traitements (Adams 1994, Lindsey et al 1994).

Les variations de l'intervalle entre l'injection d'une prostaglandine et l'ovulation ont été attribuées au statut folliculaire présent lors du traitement inducteur (Sirois et Fortune 1988, Savio et al. 1990, Kastelic et Ginther 1991). Ainsi, si la lutéolyse est induite avant que le follicule dominant ne devienne atreétique, l'ovulation apparaît-elle plus précocement. A l'inverse, elle sera différée si l'injection de prostaglandine est réalisée après que le follicule dominant ait entamé son atresie. Elle résulte vraisemblablement dans ce cas de l'ovulation du follicule dominant issu de la vague folliculaire suivante (Savio et al. 1990, Kastelic et Ginther 1991, Ko et al. 1991).

De même, selon certains auteurs, la ponction des follicules de diamètre supérieur ou égal à 5 mm 4 jours avant l'injection d'une prostaglandine entraîne une meilleure synchronisation des génisses ainsi traitées (81 % d'ovulation dans les 5 jours contre 53 % chez les génisses non ponctionnées). De même, quel que soit le stade du cycle auquel la ponction a été réalisée, on observe une nouvelle vague de croissance folliculaire dans les deux jours suivant la ponction des follicules de diamètre égal ou supérieur à 5 mm (Bergfelt et al 1994).

Plus récemment, il a été démontré que la ponction échoguidée constituait une méthode alternative intéressante pour la production d'ani-

maux transgéniques étant donné qu'elle offre la possibilité de mieux contrôler le statut sanitaire et génétique des animaux prélevés in vivo (Gibbons et al. 1995).

Enfin, la ponction échoguidée est également progressivement appliquée à *d'autres espèces animales* telles que la jument (Hinrichs et Kenney 1987, Bruck et al. 1992, Cook et al. 1992, Bracher et al. 1993, Gastal et Ginther 1995,) et la chèvre (Graff et 1995).

SUMMARY

Ultrasound-guided puncture of ovarian follicles

Through a large review of the literature, the authors have done a synthesis concerning the technical aspects, potential results and influencing factors of ultrasound-guided puncture of ovarian follicles in the bovine species (OPU : ovum pick-up). The method offers the possibility to collect an ovocyte in 57 % of punctured follicles. Three to ten ovocytes can be obtained per puncture session. Four ovocytes out of five can be brought to maturation. Among them, 50% will be fertilized and 15 % will reach the blastocyst or morula stage. The more precise determination of criteria leading to a better selection of animals and follicles to be punctured and the use of hormonal treatment like GH could improve the results and limit the large individual variations observed. The method offers some advantages. It can be applied to animals not responding to classical superovulation treatment but also to prepubertal or pregnant animals during several months without consequences for ovaries or fertility. The method also offers the possibility to sample foetal fluids and can also be applied to other animal species like horse, sheep and goat.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS G.P. Control of follicular wave dynamics in cattle. Implications for synchronisation and superovulation. *Theriogenology*, 1994, **41**:19-24.
- ARMSTRONG D.T., HOLM P., IRVINE B., PETERSEN B.A., STUBBINGS R.B., MCLEAN D., STEVENS G.F., SEAMARK R.F. Laparoscopic aspiration and in vitro maturation of oocytes from calves. *Theriogenology*, 1991, **35**:182.
- ARMSTRONG D.T., HOLM P., IRVINE B., PETERSEN B.A., STUBBINGS R.B., MCLEAN D., STEVENS G.F., SEAMARK R.F. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology*, 1992, **38**:667-678.
- ARMSTRONG D.T., IRVINE B.J., EARL C.R., MCLEAN D., SEAMARK R.F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, 1994, **42**:1227-1236.
- BAK A., GREVE T., SCHMIDT M. Effect of superovulation on reproduction. *Theriogenology*, 1989, **31**:169.
- BAVISTER B.D., HELLEKANT R., PINYOPUMMINT T. Development of in vitro matured / in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 1992, **37**: 127-146.
- BALTUSSEN R.M.W.J., VOS P.L.A.M., PIETERSE M.C., DE LOOS F.A.M., BEVERS M.M., DIELEMAN S.J. Transvaginal ultrasound-guided follicle puncture in PMSG/PG-treated cows : a comparison between three puncture needles. *Theriogenology* 1990, **34**: 129-131.
- BERGFELT D.R., KASTELIC J.P., GINTHER O.J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 1991, **24**:193.
- BERGFELT D.R., LIGHTFOOT K.C., ADAMS G.P. Ovarian synchronisation following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 1994, **42**:895-907.
- BOLS P.E.J., VAN SOOM A., DE KRUIF A. Ovum pick-up (OPU) bij het rund. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, 1994, **63**:101-108.
- BOLS P.E.J., VANDENHEEDE J.M.M., VAN SOOM A., DE KRUIF A. Transvaginal ovum pick-up (OPU): a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 1995, **43**:677-687.
- BOLS P.E.J., LEIN A., YSEBAERT M.T., VAN SOOM A., DE KRUIF A. Effects of a long term treatment with bovine somatotropin on oocyte and blastocyst yield after OPU/IVF. *Theriogenology*, 1997, **47**:315.
- BRACHER V., PARLEVLEIT J.M., PIETERSE M.C., VOS P.L.A.M., WIEMER P., Taverne M.A.M. Transvaginal ultrasound-guided twin reduction in the mare. *Vet. Rec.*, 1993, **133**:478-479.
- BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F., DRESSEL M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 1982, **27**:147-158.
- BRACKETT B.G., ZUELKE K.A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 1993, **39**:43-64.
- BROGLIATTI G.M., ADAMS G.P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, 1996, **45**:1163-1176.
- BRUCK I., RAUN B., SYNNESTVEDT B., GREVE T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound guided technique. *Equ. Vet. J.*, 1992, **24**:58-59.
- BUNGARTZ L., NIEMANN H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fert.*, 1994, **101**:583-591.
- BUNGARTZ L., LUCAS-HAHN A., RATH D., NIEMANN H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 1995, **43**:667-675.
- CALLESEN H., GREVE T., HYTTTEL P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 1986, **25**:71-86.
- CALLESEN H., GREVE T., CHRISTENSEN F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*, 1987, **27**:217.
- CARNEVALE E.M., MCKINNON A.O., SQUIRES E.L. Luteal function in the mare following preovulatory follicle fluid aspiration. *Proc. 10th Equ. Nutr. Phys. Symp.*, 1987:193-196.
- CAROLAN C., MONAGHAN P., GALLAGHER M., GORDON I. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology*, 1994, **41**:1061-1068.
- CASIDA L.E., MEYER R.K., MCSHAN W.H., WISNICKY W. Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of fecundity in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1943, **4**:76-94.
- COOK N.L., SQUIRES E.L., RAY B.S., COOK B.S., JASKO D.J. Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes. *J. of Equine Veterinary Science*, 1992, **12**:204-207.
- DE LOOS F., VAN VLIET C., VAN MAURIK P., KRUIP TH.A.M. Gamete research, 1989, **24**: 1.
- DOMINGUEZ M.M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 1995, **43**:1405-1418.
- DONNAY I., DE ROOVER R., VANLANGENDONCKA, AUQUIER P., BOMBAERTS P., KINNAR T., SCHUURBIERS N., DIVE M., MASSIP A., DESSY F. Production d'embryons bovins in vitro à partir d'ovocytes prélevés sur vaches vivantes par ponction échoguidée. Premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.*, 1996, **140**:283-291.
- DUBY R.T., DAMIANI P., LOONEY C.R., FISSORE R.A., ROBL J.M. Prepuberal calves as oocyte donors : promises and problems. *Theriogenology*, 1996, **45** :121-130.
- EAGLESOME M.D., MITCHELL D. *Theriogenology*, 1977, **7**:195.
- EDWARDS L.M., RAHE C.H., GRIFFIN J.L., WOLFE D.F., MARPLE D.N., CUMMINS K.A., PITCHETT J.F. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology* 1987, **28**: 291-299.
- EYESTONE W.H., FIRST N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, **85**:715-720.
- FAYRER-HOSKEN R.A., CAUDLE A.B. The laparoscope in follicular oocyte collection and gamete intrafallopian transfer and fertilization (GIFT). *Theriogenology*, 1991, **36**:709-725.
- FIRST N.L., PARRISH J.J. In vitro fertilization in ruminants. *J. Reprod. Fert.*, 1987, Suppl. 34, 151-165.
- FRY R. Activity report to Cook on follicle aspiration in VIAS (Victorian Institute of Animal Science). 1993
- FRY R.C., SIMPSON T.L., SQUIRES T.J., PARR R.A., DAMARIUK R.M. Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology* 1994, **41**:197.
- GASTAL E.L., KOT K., GINTHER O.J. Ultrasound-guided intrafollicular treatment in the mare. *Theriogenology*, 1995, **44**:1027-1037.
- GIBBONS J.R., BEAL W.E., KRISHER R.L., FABER E.G., PEARSON R.E., GWAZDAUSKAS F.C. Effects of once versus twice weekly transvaginal aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 1994, **41**:206.
- GIBBONS J.R., KRISHER R.L., CARLIN S.K., PEARSON R.E., GWAZDAUSKAS F.C. In vitro embryo production after microinjection and ovarian dynamics following transvaginal follicular aspiration. *Theriogenology*, 1995, **43**:1129-1139.
- GOFF A.K., GREVE T., BOUSQUET D., KING W.A. Progesterone and luteinizing hormone profiles in heifers used as oocyte donors. *Theriogenology*, 1986, **26**:577-586.
- GONG J.G., BRAMLEY T.A., WEBB R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 1993, **97**:247-254.
- GONG J.G., WILMUT I., BRAMLEY T.A., WEBB R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, 1996, **45**:611-622.

- GOTO K., KAJIHARA Y., KOSABA S., KOKA M., NAKANISHI Y., OGAWA K. Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 1988, **83**:753-758.
- GRAFF K.J., MEINTJES M., PAUL J.B., DYER V.W., DENNISTON R.S., ZIOMEK C., GODKE R.A. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH treated goats for IVF. *Theriogenology*, 1995, **44**: 223.
- GREER R.C., STAIGMILLER R.B., PARRISH J.J. Female traits, ovary and follicle characteristics, and the conditional probability of normal oocyte development after superovulation of beef cows. *J. Anim. Sci.*, 1992, **70**:263-272.
- GREVE T., MADISON V., AVERY B., CALLESEN H., HYTTTEL P. In vitro production of bovine embryos. A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 1993, **33**:51-69.
- GUILBAUT L.A., GRASSO F., LUSSIER J.G., ROUILLER P., MATTON P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fert.*, 1991, **91**:81-89.
- HASLER J.F. Current status and potential embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 1992, **75**:2857-2879.
- HINRICHS K., KENNEY R.M. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. *Theriogenology*, 1987, **27**:237.
- HUHTINEN M., RAINIO V., AALTO J., BREDBACKA P., MAKITANILA A. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*, 1992, **37**, 457-463.
- KASTELIC J.P., GINTHER O.J. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim. Reprod. Sci.*, 1991, **26**:13-24.
- KO J.C.H., KASTELIC J.P., DEL CAMPO M.R., GINTHER O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 1991, **91**:511-519.
- KRUIP Th.A.M. Current topics in Veterinary Medicine and Animal Science. 1982, Vol. 20, Eds H.Karg and E.Schallenger. The Hague, Boston, London, Martinus Nijhoff p95.
- KRUIP Th.A.M., PIETERSE M.C., VAN BENEDEN TH., VOS P.L.A.M., WURTH Y.A., TAVERNE M.A.M. Increased success rates of IVM and IVF in the bovine after sonographic guided transvaginal collections of the oocytes. *Theriogenology*, 1990, **33**:269.
- KRUIP Th.A.M., PIETERSE M.C., VAN BENEDEN TH., VOS P.L.A.M., WURTH Y.A., TAVERNE M.A.M. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *Vet. Rec.* 1991; **128**:208-210.
- KRUIP Th.A.M., BONI R., ROELOFSEN M.W.M., WURTH Y.A., PIETERSE M.C. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 1993, **39**:251.
- KRUIP Th.A.M., BONI R., WURTH Y.A., ROELOFSEN M.W.M., PIETERSE M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle *Theriogenology*, 1994, **42**:675-684.
- LAMBERT R.D., BERNARD C., RIOUX J.E., BELAND R., D'ARMOUS D., MONTREUIL A. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, 1983, **20**:149-161.
- LAMBERT R.D., SIRARD M.A., BERNARD C., BELAND J., RIOUX J.E., LECLERC P., MENARD D.P., BEDOYA M. In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. *Theriogenology*, 1986, **25**:117-133.
- LANSBERGEN L.M.T.E., VAN WAGTENDONK-DE LEUW A.M., DE DAAS J.H.G., DE RUIGH L., VAN DER STREEK G., REINDERS J.M.C., AARTS M., RODEWIJK J. Factors affecting ovum pick up in cattle. *Theriogenology*, 1995, **43**:259.
- LAURENCIK J., PICHA J., PICHOVA D., OBERFRANC M. Timing of laparoscopic aspiration of preovulatory oocytes in heifers. *Theriogenology*, 1991, **35**:415-423.
- LEIBFRIED L., FIRST N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, 1979, **48**:76-86.
- LEIBFREID RUTLEDGE M.L., CRISTER E.S., EYESTONE W.H., NORTHEY D.L., FIRST N.L. Development potential of bovine oocytes matured in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.*, 1987, **36**:376-383.
- LINDSEY B.R., LOONEY C.R., FUNK D.J., FABER D.C., GUE C.S., KRAMER A.J. The effect of apparent dominant follicle removal (DFR) prior to FSH treatment on superstimulated response in problem donors. *Theriogenology*, 1994, **41**:238.
- LEIBO S.P., RALL W.F. Prenatal diagnosis of sex in bovine fetuses by amniocentesis. *Theriogenology*, 1990, **33**:531-552.
- LOONEY C.R., DAMIANI P., LINDSEY B.R., LONG C.R., GONSETH C.L., JOHNSON D.L., DUBY R.T. Use of prepuberal heifers as oocyte donors for IVF: effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology*, 1995, **44**: 269.
- LOONEY C.R., LINDSEY B.R., GONSETH C.L., JOHNSON D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 1994, **41**:67-72.
- LU K.H., GORDON I., CHEN H.B., GALLAGHER M., MCGOVERN H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.*, 1987, **121**:259-260.
- LU K.H., POLGE C. A summary of two years results in large scale in vitro bovine embryo production. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.* (The Hague), 1992, **3**:1315-1317.
- MAURER R.R., SUSS U., WISE T.H. Oocyte quality in superovulated beef heifers with and without norgestomet implants. *Theriogenology*, 1987, **27**:256.
- MEINTJES M., BELLOW M.S., BROUSSARD J.R., PAUL J.B., GODKE R.A. Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology*, 1993, **39**:266.
- MEINTJES M., BELLOW M.S., BROUSSARD J.R., PACCAMONTI D., EILTS B.E., GODKE R.A. Repeated transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from pregnant mares. *Theriogenology*, 1994, **41**:255.
- MEINTJES M., BELLOW M.S., BROUSSARD J.R., PAUL J.B., GODKE R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *J. Anim. Sci.* 1995, **73**:967-974.
- MORENO J.F., TURCZUNSKI C.J., FLORES-FOXWORTH G., KRAEMER D.C. Influence of parity of donor and presence of CL on quantity and quality of bovine oocytes from ovarian follicles aspirated post-partum. *Biol. Reprod.*, 1992, **46** (Suppl 1), 65.
- MOYO P., DOBSON H. Collection, in vitro fertilisation and culture of bovine oocytes intravaginally or in a conventional incubator. *Vet. Rec.*, 1995, **136**:115-118.
- PIETERSE M.C., KAPPEN K.A., KRUIP Th.A.M., TAVERNE M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988; **30**:751-762.
- PIETERSE M.C., TAVERNE M.A.M., KRUIP Th.A.M., WILLEMSE A.H. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. *Vet. Rec.*, 1990, **126**:552-554.
- PIETERSE M.C., VOS P.L.A.M., KRUIP Th.A.M., WURTH Y.A., VAN BENEDEN TH.H., WILLEMSE A.H., TAVERNE M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 1991a, **35**:857-862.
- PIETERSE M.C., VOS P.L.A.M., KRUIP Th.A.M., WILLEMSE A.H., TAVERNE M.A.M. Characteristics of bovine oestrus cycles during repeated ultrasound-guided punctures of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, 1991b, **35**:401-413.
- PIETERSE M.C., VOS P.L.A.M., KRUIP Th.A.M., WURTH Y.A., VAN BENEDEN TH.H., WILLEMSE A.H., TAVERNE M.A.M. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in eCG-treated cows. *Theriogenology*, 1992, **37**:273.
- RATH D. Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transf. Newsl.*, 1993, **11**:10-15.

- REICHENBACH H.D., WIEBKE N.H., BESENFELDER U.H., MÖDL J., BREM G. Transvaginal laparoscopy guided aspiration of bovine follicular oocytes: preliminary results. *Theriogenology*, 1993, **39**:293.
- REICHENBACH H.D., WIEBKE N.H., WENIGERKIND H., MÖDL J., BREM G. Bovine follicular oocytes collected by laparoscopic guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 1994, **41**:283.
- ROELOFSEN-VENDRIG M.W.M., BONI R., WURTH Y.A., PIETERSE M.C., KRUIP Th.A.M. Possibilities of ovum pick-up in cattle. *Tijdschr. Diergeneeskde.*, 1994, **119**:61-63.
- RYAN D.P., BLACKWOOD E.G., SWANSON W.F., RODRIGUEZ H., GODKE R.A. The use of follicle stimulating hormone (FSH) to stimulate follicle development for in vitro fertilization during the first trimester of the pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1990, **33**:315.
- RYAN D.P., BLACKWOOD E.G., SWANSON W.F., RODRIGUEZ H., GODKE R.A. Using hormone-treated pregnant cows as a potential source of oocytes for in vitro fertilization. *Theriogenology*, 1993, **40**:1039-1055.
- SAUMANDE J., PROCUREUR R., CHUPIN D. Effect of injection time of anti-PMSG on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cow. *Theriogenology*, 1984, **21**:727-731.
- SAVIO J.D., KEENAN L., BOLAND M.P., ROCHE J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 1988, **83**:663-671.
- SAVIO J.D., BOLAND M.P., ROCHE J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, 1990, **88**:581-591.
- SCOTT C.A., ROBERTSON L., DE MOURA R.T.D., Paterson C., Boyd J.S. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.* 1994, **134**:440-443.
- SHIOYA Y., KUWAYAMA M., FUKUSHIMA M., IWASAKI S., HANADA A. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*, 1988, **30**:489-496.
- SIMON L., BUNGARTZ D., RATH D., NIEMANN H. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanent rinsed ultrasound guided aspiration unit. *Theriogenology*, 1993, **39**:312.
- SIMONETTI S., VEECK L.L., JONES H. Correlation of follicular fluid volume with oocyte morphology from follicles stimulated by human menopausal gonadotropin. *Fertil. Steril.* 1985, **44**:177-180.
- SIRARD M.A., LAMBERT R.D. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, 1985, **33**:487-494.
- SIRARD M.A., LAMBERT R.D. Birth of calves after in vitro fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.*, 1986, **119**:167-169.
- SIROIS J., FORTUNE J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 1988, **39**:308-317.
- SKYER D.M., GARVERICK H.A., YOUNGQUIST R.S., KRAUSE G.F. Ovarian follicular populations and in vitro steroidogenesis on three different days of the bovine oestrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 1987, **64**:1710-1716.
- SPRECHER D.J., KANNEENE J.B. Diagnostic techniques for transvaginal-transuterine aspiration of bovine fetal fluid during the early fetal period. *Theriogenology*, 1992, **38**:581-587.
- STAIGMILLER R.B., ENGLAND B.G. Folliculogenesis in the bovine. *Theriogenology*, 1982, **17**:42-52.
- STUBBINGS R.B., ARMSTRONG D.T., BERIAULT R.A., BASRUR P.K. A method for aspirating bovine oocytes from small vesicular follicles: preliminary results. *Theriogenology*, 1988, **29**:312.
- STUBBINGS R.B., LIPTRAP R.M., BASRUR P.K. The assessment of follicular parameters for the selection of oocytes recovered from superovulated heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 1990, **23**:181-195.
- VAN DER SCHANS A., VAN DER WESTERLAKEN A.J., DE WIT A.A.C., EYESTONE W.H., DE BOER H.A. Ultrasound guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 1991; **35**:288.
- VAN SOOM A., VAN VLAENDEREN I., MAHMOUDZADEH A.R., YSEBAERT M.T., DE KRUIF A. Salvage of oocytes from sterile genetically valuable cows, resulting in the birth of a calf. *Anim. Reprod. Sci.*, 1994, **36**:187-196.
- VILLA-GODOY A., IRELAND J.J., WORTMAN J.A., AMES N.K., HUGHES T.L., FOGWELL R.L. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. *J. Anim. Sci.*, 1985 **60**:519-527.
- VOGELSANG M.M., KREIDER J.L., BOWEN M.J., POTTER G.D., FORREST D.W., KRAEMER D.C. Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology*, 1988, **29**:1007-1018.
- VOS P.L.A.M., PIETERSE M.C., VAN DER WEYDEN G.C., TAVERNE M.A.M. Bovine fluid collection: transvaginal, ultrasound guided puncture technique. *Vet. Rec.*, 1990; **127**:502-504.
- VOS P.L.A.M., DE LOOS F.A.M., PIETERSE M.C., BEVERS M.M., TAVERNE M.A.M., DIELEMAN S.J. Transvaginal ultrasound-guided follicle puncture as a technique to collect individual combinations of oocyte-cumulus-complexes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in PMSG/PG-treated cows. 6^e Réunion AETE-Lyon, 7-8 Septembre 1990.
- VOS P.L.A.M., DE LOOS F.A.M., PIETERSE M.C., BEVERS M.M., TAVERNE M.A.M., DIELEMAN S.J. Evaluation of transvaginal ultrasound guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. *Theriogenology*, 1994, **41**:829-840.
- WALTON J.S., CHRISTIE K.A., STUBBINGS R.B. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine dynamics. *Theriogenology*, 1993, **39**:336.
- WILLET E.L., BLOCK W.G., CASIDA L.E., STONE W.H., BUCKNER P.J. Successful transplantation of a fertilised bovine ovum. *Science*, 1951, **113**:247.
- XU K.P., GREVE T., CALLESEN H., HYTTEL P. Pregnancy resulting from in vitro fertilization of bovine oocyte matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 1987, **81**:501-504.
- XU K.P., HILL B., BETTERIDGE K.J. Application of in vitro fertilization techniques to obtain calves from valuable cows after slaughter. *Vet. Rec.*, 1992, **130**:204-206.