

ARTICLE ORIGINAL

Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine

ECTORS F.J.*, DELVAL A.**, BECKERS J.-F.**, DRION P.-V.**, REMY B.**, ECTORS F.**

* Laboratoire de Recherche en Reproduction Humaine
CHU Saint-Pierre, rue Haute, 322 1000 Bruxelles

** Centre IRSIA CERAD 2
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Liège, Bât. B 41, 4000 Sart-Tilman

Ce travail a été réalisé

au sein du Service d'Obstétrique de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, avec le soutien de crédits de l'IRSIA.
Ces recherches sont actuellement poursuivies au CHU Saint-Pierre, avec l'aide financière d'une bourse de la "Fondation Vésale".

RESUME. Une technique de clonage par transfert nucléaire dont toutes les étapes ont été réalisées exclusivement *in vitro* a été mise au point. Les embryons reconstitués du premier cycle de clonage ont été utilisés comme donneurs de blastomères pour le second cycle (reclonage). Cette technique nous a permis d'obtenir respectivement 14,5% de morula et 14,9% de blastocystes après le premier et le second cycle de transfert nucléaire. Les pourcentages de naissance obtenus, après transfert de tels embryons, sont de 21,4% et 20,8% pour, respectivement, le premier et le deuxième cycle, correspondant à 6 et 5 veaux nés pour 28 et 24 embryons transférés. Cependant, des pathologies de la gestation et une augmentation du poids des nouveau-nés ont été observés. Il semblerait que la présence *in vitro* des gamètes et/ou des embryons soit à l'origine d'une altération du contrôle de l'expression de certains gènes.

INTRODUCTION

Le clonage par transfert de noyau est une technique de multiplication asexuée permettant de produire, à partir d'un organisme unique, un ensemble d'individus identiques possédant le même patrimoine génétique. Ce mode de reproduction existe naturellement chez les êtres unicellulaires, chez les végétaux ainsi que chez les animaux de type coloniaux tels que les hydres et les madrépores. Chez les vertébrés, la reproduction asexuée n'existe pas si l'on excepte la formation de vrais jumeaux qui peut notamment se produire par division du bouton embryonnaire, laquelle peut avoir lieu lors de l'éclosion (Massip et al., 1983).

Pour réussir le clonage chez les mammifères et obtenir un individu adulte capable de se reproduire, il faut remplacer le génome haploïde

ovocytaire par le noyau diploïde contenu dans une cellule embryonnaire totipotente qui, dans le cas présent, est un blastomère.

Chez les animaux de ferme, la réalisation du clonage par transfert de noyau est délicate car elle implique la succession d'une série de manipulations qui doivent toutes réussir pour aboutir au résultat final. Les différentes manipulations sont schématisées dans la figure 1 et comprennent successivement : la maturation de l'ovocyte, son énucléation, l'injection du blastomère de l'embryon donneur dans l'espace périvitellin suivie de son incorporation dans le cytoplasme ovocytaire, l'activation de ce dernier et enfin la coculture des embryons reconstitués. A ce jour, la naissance d'animaux issus du transfert nucléaire a été obtenue pour les espèces sui-

- mouton, par Willadsen (1986),
- vache, par Prather et al. (1987),
- lapin, par Stice et Robl (1988),
- porc, par Prather et al. (1989),
- chèvre, par Yong et al. (1991).

Tous ces auteurs ont utilisé des ovocytes non fécondés et énucléés comme cytoplasmes receveurs.

Vu les intérêts scientifiques et économiques qu'une technique de clonage peut apporter à l'élevage, nous avons entrepris d'en étudier chacune des étapes pour tenter d'arriver à une production de clones d'importance suffisante. Pour des raisons pratiques, nous avons voulu dès le départ, nous orienter vers le développement d'une technique de clonage où toutes les étapes sont réalisées *in vitro* : production des ovocytes receveurs et des embryons donneurs et développement des embryons reconstitués jusqu'au stade de morula (J 5-6) ou de blastocyste

(J 7). Les morulas ainsi obtenues peuvent servir d'embryons donneurs pour un second cycle de clonage.

MATERIEL ET METHODES

Les embryons donneurs

Les embryons donneurs ont été produits *in vitro* suivant le protocole décrit précédemment (Ectors et al., 1993a) et ont été utilisés sans congélation préalable, au J5 ou 6 de leur développement (Ectors et al., 1993b; 1995). Pour en séparer les blastomères, la morula est d'abord maintenue à l'aide d'une pipette (pipette de maintien : diamètre extérieur de 110 μm et diamètre intérieur 25 μm) tandis qu'une aiguille est utilisée pour ouvrir sa zone pellucide. L'amas cellulaire est ensuite extrait à l'aide d'une fine pipette calibrée (pipette émoussée dont le diamètre de l'orifice est légèrement inférieur à celui des blastomères) qui est ensuite utilisée pour disloquer l'embryon par aspirations successives. Cette opération est facilitée par l'emploi de PBS (phosphate buffered saline) dépourvu de calcium et de magnésium, mais additionné d'un inhibiteur réversible de la polymérisation des microfilaments : la cytochalasine B (CCB, Sigma : C-6762; 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Les ovocytes receveurs

Les ovocytes immatures sont obtenus par ponction d'ovaires récoltés aux abattoirs. Seuls les follicules de 1 à 8 mm de diamètre sont aspirés, les ovocytes entourés d'un cumulus oophorus dense et homogène, sont placés en maturation dans un milieu TCM 199 bicarbonaté additionné de 20% de sérum de vache en proœstrus (J20 du cycle œstral), de 0,27 mM de pyruvate de sodium, de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pFSH, de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pLH, de 100 UI/ml de pénicilline et de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine. Cette culture, comme toutes les autres, est réalisée à 39°C dans une atmosphère de 5% de CO_2 , saturée en eau. Après 24 heures, les complexes ovocytes-cumulus sont exposés pendant 10 minutes à l'action d'une solution de hyaluronidase (Sigma : H-3506) à la concentration

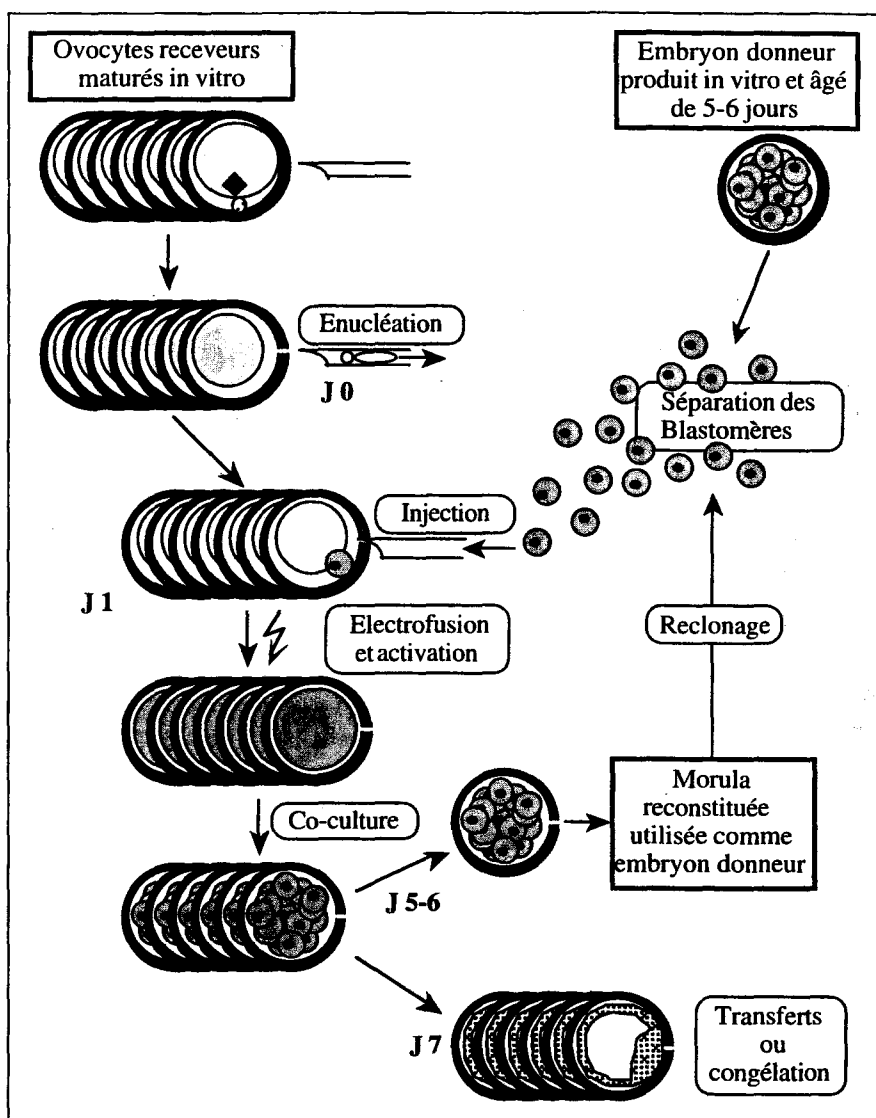


Figure 1

Schéma général du clonage :

Après séparation des blastomères issus de l'embryon donneur (morula âgée de 5 ou 6 jours), ceux-ci sont injectés isolément dans l'espace périvitellin des ovocytes mûrs préalablement énucléés. L'introduction du noyau donneur dans le cytoplasme ovocytaire est consécutive à la fusion des membranes, fusion provoquée par une impulsion électrique. Les embryons reconstitués sont cultivés *in vitro* en présence de cellules épithéliales tubaires (co-culture). Au 5-6^e jour de leur développement, l'une de ces morula peut servir d'embryon donneur pour un reclonage, tandis que les autres sont cultivées jusqu'au stade blastocyste (7^e jour) en vue de leur transfert dans des vaches receveuses.

de 1 mg/ml, afin de dissocier le cumulus oophorus. Les dernières cellules de la corona radiata sont éliminées par agitation vigoureuse au vortex pendant 5 minutes dans du PBS dépourvu de calcium et de magnésium.

Techniques de micromanipulation

Toutes ces opérations sont réalisées à l'aide d'un microscope inversé de type Nikon Diaphot (grossissement de 100x) équipé de deux micromanipulateurs mécaniques Leitz et d'un microinjecteur Narishige de type IM 5b.

a) Énucléation de l'ovocyte

Une fois dénudés, les ovocytes sont sélectionnés en fonction de la présence de leur premier globule polaire. Seuls ces ovocytes sont exposés à la CCB (7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). L'opération d'énucléation est réalisée au moyen d'une pipette de maintien et d'une pipette d'aspiration plus fine (diamètre extérieur 30 μm , diamètre intérieur 20 μm). Le globule polaire et approximativement un quart du cytoplasme adjacent sont aspirés. L'absence de noyau est contrôlée par incubation momentanée (10 minutes) des ovocytes micromanipulés

avec un colorant fluorescent (Hoechst 33342; Sigma B-2261; 5 µg/ml), suivie d'une exposition temporaire (<10 secondes) à la lumière UV. Les ovocytes effectivement énucléés, ou cytoplastes, sont remis en culture dans leur milieu de maturation pour une durée de 15 à 17 heures.

b) Transfert de blastomère, électrofusion et activation du cytoplaste

Les blastomères isolés sont introduits dans l'espace périvitellin des cytoplastes au moyen d'une pipette d'injection dont le diamètre est fonction de la taille des blastomères. Immédiatement après la micro-manipulation, les couples cytoplaste-blastomère sont soumis à un champ électrique (une impulsion de 2,7 Kvols/cm pendant 50 microsecondes), afin de provoquer la fusion des deux membranes plasmiques et l'activation du cytoplaste. La chambre d'électrofusion est constituée de deux fils de platine de 100 µm de diamètre et espacés de 240 µm. Elle est remplie d'un milieu non conducteur répondant à la composition suivante : mannitol (Sigma : M-1902; 0,28 M), CaCl₂ (0,01 mM) et MgSO₄ (0,1 mM). Ces ions sont nécessaires à l'activation de l'ovocyte.

Développement des embryons reconstitués

Les embryons reconstitués sont développés *in vitro* en coculture avec des cellules épithéliales flottantes provenant d'oviductes bovins. La co-culture est réalisée en gouttes de 50 µl de Ménézo B2, recouvertes d'huile minérale. Le développement est observé après 3, et 6 ou 7 jours en vue d'évaluer les pourcentages de clivage, de stade VIII et de morulas ou de blastocystes. Les embryons obtenus sont destinés, soit à être utilisés comme donneurs pour un second cycle de transfert nucléaire après 6 jours de culture, soit à être transférés dans des vaches receveuses synchrones au 7^e jour de leur développement.

Contrôle de la qualité des embryons produits

L'évaluation de la qualité du développement est réalisée par comptage des noyaux après fixation d'un

échantillon des blastocystes obtenus. Le fixateur est composé d'un mélange d'éthanol et d'une solution de citrate de Na (1/3, v/v) additionné de 10 µg de colorant Hoechst 33342. Les embryons à fixer sont placés sur une lame siliconée dans un minimum de liquide, et sont recouverts par une goutte de fixateur ($\pm 20 \mu\text{l}$). La lame est placée à 37°C pendant 3 à 5 minutes. Après ce laps de temps, le fixateur est éliminé, les embryons sont noyés dans une goutte d'Histomount et le tout est recouvert d'un couvre-objet. Les lames sont examinées à un grossissement de 100x au moyen d'un microscope équipé pour la fluorescence, (miroir dichroïque de 400nm, et des filtres de 340 à 380nm). L'exposition à la lumière ultraviolette permet de révéler et de dénombrer les noyaux.

RESULTATS

Lors de ce travail, le nombre moyen d'embryons reconstitués par donneur a été de 25,2 à l'issue du premier cycle et de 19,7 lors du deuxième cycle (Tableau 1). Après

développement, nous avons constaté une grande variabilité dans les résultats en terme de pourcentage de blastocystes. Il nous a semblé que certaines familles issues d'un embryon donneur avaient une plus grande potentialité de développement que d'autres. Cependant, le test de corrélation (test de Student) réalisé entre les résultats obtenus au premier et au deuxième cycle n'a pas pu mettre en évidence un effet de l'embryon donneur car l'effectif est trop peu important (Ectors et al., 1995).

Le Tableau 2 montre que le nombre de noyaux contenus dans les embryons issus de la FIV est plus important que celui des embryons issus du premier et du deuxième cycle de transfert nucléaire.

Après transfert de deux embryons dans des receveuses synchrones, les taux de naissance obtenus sont de 21,4 et 20,8% pour le premier et le deuxième cycle de clonage (6 et 5 veaux pour 28 et 24 embryons transférés); soit 21,1% (11/52) au total.

Plusieurs pathologies se sont présentées (Ectors et al., 1996) : avortement

Tableau 1
Pourcentages de développement obtenus après FIV et après un premier et deuxième cycle de transfert nucléaire

	Moyenne des % $\pm$ DS (n)	Extrêmes
FIV : (n = 634)		
Clivage (J 3)	76.5 $\pm$ 10 (485)	60 - 86
8-cell. (J 3)	48.4 $\pm$ 11 (307)	34 - 59
Morula (J 5)	23.8 $\pm$ 6 (151)	20 - 35
1^{er} cycle : (n = 228; nombre moyen d'embryons reconstitués par donneur = 25,2)		
Clivage (J 3)	86.8 $\pm$ 17 (198)	41 - 92
8-cell (J 3)	22.8 $\pm$ 10 (52)	8 - 36
Morula (J 6)	14.5 $\pm$ 12 (33)	0 - 30
2^e Cycle : (n = 303; nombre moyen d'embryons reconstitués par donneur = 19,7)		
Clivage (J 3)	78.2 $\pm$ 7 (237)	66 - 89
8-cell (J 3)	28.7 $\pm$ 9 (87)	18 - 43
Blastocystes (J 7)	14.9 $\pm$ 12 (45)	0 - 41

Tableau 2
Nombre moyen de noyaux pour des blastocystes fixés après FIV, premier et deuxième cycle de transfert nucléaire :

	Nb moyen de noyaux ($\pm$ DS)	Extrêmes
FIV : (n = 48)	105.2 $\pm$ 3.21	69-148
1^{er} cycle : (n = 25)	63.8 $\pm$ 4.9	35-135
2^e cycle : (n = 11)	49.1 $\pm$ 5.0	30-83

précoce (2 cas), mortalité fœtale avec momification (1 cas), placenta montrant une structure anormale bien localisée ressemblant à une môle hydatiforme embryonnée (1 cas), hydramnios et œdème fœto-placentaire (2 cas). Un veau est né avec le syndrome de la bouleture (1 cas), et deux nouveau-nés ont développé une omphalo-phlébite secondaire à un œdème important du cordon. Lors du transfert d'embryons du premier cycle, toutes les gestations, à l'exception de la gestation gémellaire, ont dépassé leur terme de 6 à 16 jours. Le poids moyen des veaux obtenus pour les gestations simples est de 40 Kg, ce qui correspond à la normale (moyenne : 40.7 ± 5.2 Kg) pour des veaux de race BBB. Lors du transfert d'embryons du deuxième cycle, nous avons également observé une prolongation de la gestation de 2 à 12 jours pour les gestations simples du deuxième cycle tandis que le poids moyen des veaux obtenus, toujours par gestation simple, était de 65 Kg, ce qui est fort élevé. Quant au sexe des veaux, nous avons enregistré une prédominance des mâles par rapport aux femelles : 6 clones mâles versus 2 clones femelles (Tableau 3).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

En moyenne, 25,2 embryons reconstitués ont été obtenus par donneur lors de la réalisation du premier cycle de transfert nucléaire, contre 19,7 lors du second. Ces chiffres sont légèrement inférieurs à ceux publiés par Stice et Keefer (1993) qui obtiennent 27,5 reconstitués par donneur, au premier comme au deuxième cycle. Les taux de développement *in vitro* obtenus suite au deuxième cycle de clonage (14,9% de blastocyste) sont pratiquement identiques à ceux enregistrés lors du premier cycle de micromanipulation (14,5% de morula; Tableau 1). Les noyaux de ces embryons sont donc capables d'être reprogrammés une deuxième fois, et de contrôler le développement jusqu'au stade blastocyste.

Comme Westhusin et al. (1991) ainsi que Stice et Keefer (1993), nous avons constaté une grande variabilité dans les résultats dont l'origine doit être recherchée soit au niveau de

Tableau 3
Caractéristiques des veaux obtenus

Nom du veau	A	B	C
1^{er} cycle :			
Mannitol	+7	40	M
Zappatta	+6	35	M
Rouge	+13	40	M
Noir	+6	40	M
Laurel*	-7	30	M
Hardy*	"	30	M
Castafiore	+16	45	F
Moyenne $\pm$ DS = 37.1 ± 2.1			
2^e cycle :			
Dupont**	+12	70	M
Dupont**	+11	70	M
Nana***	+2	55	F
Décima***	+2	45	F
Martha†	+2	35	F
Moyenne $\pm$ DS = 55.0 ± 6.9			

A : nombre de jours en plus ou en moins par rapport à la durée normale de gestation qui est de 281 jours.

B : poids des veaux à la naissance (Kg).

C : sexe des veaux.

* veaux identiques issus de la même receveuse.

** veaux identiques issus de la même receveuse.

*** trois veaux identiques issus de deux receveuses différentes (Nana dans une, Décima et Martha dans l'autre).

l'ovocyte receveur, soit de l'embryon donneur. Il est actuellement admis que seulement 30% des ovocytes soumis à la MIV et à la FIV sont aptes à assurer un développement jusqu'au stade blastocyste. Ce faible pourcentage est lié à une grande hétérogénéité des ovocytes récoltés, couplée à des conditions de maturation *in vitro* qui ne sont pas encore idéales. D'autre part, cette hétérogénéité se retrouve également au niveau des embryons donneurs qui ne possèdent pas tous le même potentiel de développement, mais encore au sein d'un même embryon car ses blastomères ne sont pas tous équivalents du fait de l'asynchronie des cycles cellulaires.

Parallèlement aux transferts d'embryons clonés, certains blastocystes ont été fixés dans le but de dénombrer leurs noyaux. Les résultats mentionnés dans le Tableau 2 montrent qu'il y a approximativement deux fois plus de noyaux pour les embryons issus de la FIV que pour ceux issus du premier cycle de clonage. Les embryons clonés auraient donc probablement un cycle de division cellulaire en retard. Les causes de cet effet délétère doivent être re-

cherchées dans les nombreuses manipulations du clonage, mais également dans le fait que l'énucléation enlève $\pm 1/4$ du cytoplasme ovocytaire. Si cette diminution du nombre de noyaux est déjà présente dans les embryons du premier cycle, elle est légèrement plus marquée après reclonage, ce qui semble indiquer que la durée de culture *in vitro* pourrait également être mise en cause.

En ne tenant compte que des transferts synchrones de deux embryons, les pourcentages de veaux nés atteignent un niveau appréciable aussi bien pour le premier que pour le deuxième cycle de clonage. L'absence de différence significative entre les deux cycles par rapport au nombre de blastocystes transférés, montre que 21,2% (11/52) des embryons produits par clonage et reclonage sont capables d'engendrer une gestation évolutive. Concernant le premier cycle, ces résultats concordent avec ceux présentés par Bondioli et al. (19,5%; 1991), Westhusin et al. (20 à 23%, 1991) et Stice et Keefer (10%, 1993) alors que Willadsen et al. (1991) ont enregistré des résultats nettement supérieurs, soit 36,4% de veaux nouveau-nés. Tous ces auteurs ont utilisé des embryons donneurs produits *in vivo* et ont développé les embryons reconstitués dans des oviductes de brebis. Heyman et al. (1994) ont utilisé également des embryons donneurs produits *in vivo* mais ont cultivé leurs embryons reconstitués en coculture et ils ont obtenu 32% de veaux. Concernant le reclonage, Stice et Keefer (1993) ont publié leurs résultats, mais ils ne font état que de la naissance d'un veau pour 48 embryons transférés. Tout récemment, Lebourlis et al. (1996) ont obtenu, *in vitro* en coculture, des pourcentages de blastocystes similaires après le premier et le second cycle de clonage (30,6 versus 27,7%). Après transfert dans des receveuses, ces embryons ont donné lieu à des taux de gestation similaires (36,3 versus 28,5%).

Le taux de mortalité embryonnaire est relativement important après transfert d'embryons clonés et est associé à des pathologies de la gestation et à une augmentation du poids des nouveau-nés. Ce phénomène est observé également dans d'autres espèces telles que

le lapin, le porc et le mouton (First et Prather, 1991); il a également été décrit après maturation, fécondation et développement *in vitro* d'ovocytes et d'embryons bovins (Farin and Farin, 1995; Thonon et Ectors, résultats non publiés). Ces constatations semblent indiquer que ces pathologies ne sont pas spécifiquement liées à la technique du transfert nucléaire, mais semblent être induites par les conditions de culture *in vitro*. Il semblerait que, — soit la maturation *in vitro* d'ovocytes incomplètement compétents, — soit l'exposition des ovocytes et/ou des embryons à des milieux de culture présentant des facteurs embryotoxiques et/ou ne contenant pas de facteurs embryotrophes, — ou l'association de ces deux conditions, soient à l'origine d'une altération du contrôle de l'expression de certains gènes. Plusieurs d'entre-eux sont sans doute susceptibles d'être atteints, ce qui expliquerait la variabilité des phénotypes observés allant de la normalité à l'arrêt du développement aux stades préimplantatoires, en passant par la mortalité embryonnaire précoce

et l'avortement. Une atteinte du gène de l'IgF2 ou du gène de son récepteur pourrait ne pas compromettre la survie de l'embryon et du fœtus et expliquer l'hypertrophie placentaire et l'augmentation du poids des veaux nouveau-nés (Westhusin et al., 1995). Ces gènes sont soumis à l'empreinte parentale et impliqués dans le contrôle du développement trophoblastique, si bien qu'on peut supposer que les altérations placentaires observées soient le fruit d'une dérégulation de leur expression, comme cela a été observé chez la souris (DeChiara et al., 1990).

Lorsque l'on sait qu'aujourd'hui, l'évolution des techniques de procréation assistée dans l'espèce humaine va de paire avec l'augmentation de la durée de présence *in vitro* des gamètes et des embryons, il devient essentiel de préciser l'effet du séjour *in vitro* sur le contrôle du développement embryonnaire et fœto-placentaire. La compréhension de l'origine de ces syndromes devrait nous permettre d'en éviter l'apparition chez l'Homme.

SUMMARY

Cloning by nuclear transfer in the bovine species

A all *in vitro* cloning technique was developed in which the reconstituted embryos from the first cycle nuclear transfer (cloning) were used as blastomere donor for the second cycle nuclear transfer (recloning). Such method permitted to produce 14,5% of morulae and 14,9% of blastocysts after the first and second cycle of nuclear transfer, respectively. The rates of birth obtained after transfer of such embryos were 21,4 % et 20,8 % for first and second cycle respectively, corresponding to 6 et 5 calves for 28 et 24 transferred embryos. Unfortunately, gestation pathologies and an increase of birth weights were observed. It seems that the *in vitro* presence of gametes and/or embryos may be responsible of an alteration in the control of gene expression.

BIBLIOGRAPHIE

- BONDIOLI K.R. Nuclear transfer in cattle. Proc. Int Symposium Anim. Biotech. 1991. Kyoto Japan.
- DECHIARA T.M., A. EFSTRATIADIS ET E.J. ROBERTSON. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990, **345**, 78-80.
- ECTORS F.J., THONON F., DELVAL A., FONTES R.S., TOUATI K., BECKERS J.F., ECTORS F. Comparison between culture of bovine embryos *in vitro* versus development in rabbit oviducts and *in vivo*. *Liv. Prod. Sci.* 1993a, **36**, 29-34.
- ECTORS F.J., DELVAL A., TOUATI K., THONON F., BECKERS J.F., ECTORS F. Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine : premiers résultats. *Ann. Méd. Vét.* 1993b, **137**, 427-431.
- ECTORS F.J., DELVAL A., SMITH L.C., TOUATI K., REMY B., BECKERS J.F., ECTORS F. Viability of cloned bovine embryos after one or two cycles of nuclear transfer and *in vitro* culture. *Theriogenology* 1995, **44**, 925-933.
- ECTORS F.J., DELVAL A., SMITH L.C., SULON J., TOUATI K., REMY B., BECKERS J.F., ECTORS F. Trophoblastic dysregulations in pregnancies resulting from transfer of cloned embryos in the bovine species. 12^e Colloque Scientifique de l'«Association Européenne du Transfert Embryonnaire» en Septembre 1996 à Lyon, 95-102.
- FARIN, FARIN. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* : survival and fetal development. *Biol. Reprod.* 1995, **52**, 676-682.
- FIRST N.L., PRATHER R.S. Production of embryos by oocyte cytoplasm-blastomere fusion in domestic animals. *J. Reprod. Fertil.* 1991, Suppl. **43**, 245-254.
- HEYMAN Y., CHESNÉ P., LEBOURHIS D., PEYNOT N. J., RENARD J.P. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source : *in vivo* versus *in vitro*. *Theriogenology* 1994, **42**, 695-702.
- LEBOURHIS D., DENIAU F., RENARD J.-P., HEYMAN Y. Bovine nuclear transfer : *in vitro* and *in vivo* development of second generation clones. 12^e Colloque Scientifique de l'«Association Européenne du Transfert Embryonnaire» en Septembre 1996 à Lyon, 160.
- MASSIP A., VANDERZWALMEN P., MULNARD J., ZWIJSEN W. Atypical hatching of a cow blastocyst leading to separation of complete twin half blastocysts. *Vet. Rec.* 1983, **112**, 301.
- PRATHER R.S., BARNES F.L., SIMS M.M., ROBL J.M., EYESTONE M.H., FIRST N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo : assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 1987, **37**, 859-866.
- PRATHER R.S., SIMS M.M., FIRST N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 1989, **41**, 414-418.
- STICE S.L., ROBL J.M. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. and Dev.* 1989, **25**, 272-280.
- STICE S.L., KEEFER C.L. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 1993, **48**, 715-719.
- WESTHUSIN M.E., PRYOR J.H., BONDIOLI K.R. Nuclear transplantation in the bovine embryo : a comparison of 5-day, 6-day, frozen thawed and nuclear transfer donor embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, **28**, 119-123.
- WESTHUSIN M.E., ARCELLANA-PANLILIO M., HARVEY M., JONES K., SCHULTZ G.A. Gene expression in cloned bovine embryos. In IETS Satellite Symposium on «Application of molecular biology to reproduction» 1995, Ed. Schultz G.A. and Westhusin M.E., University of Calgary Health Sciences Center, Calgary.
- WILLADSEN S.M. Cloning sheep and cow embryos. *Genome* 1989, **31**, 956-962.
- WILLADSEN S.M., JANZEN R.E., MCALISTER R.J., SHEA B., HAMILTON G., MCDERMAND D. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 1991, **35**, 161-170.
- YONG Z., JIANCHEN W., JUFEN Q., ZHIMING H. Nuclear transplantation in goats. *Theriogenology* 1991, **35**, 299.