Mfr 89 0175

9499

Institut d'Elevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays Tropicaux
10, rue Pierre Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général-de-Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES

PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

M1

LA FECONDATION IN VITRO ET LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LES BOVINS

par

Marie STEINER

Bibliothèque de V.L.E.M.V.T.

année universitaire 1988-1989

9499

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs, 13, rue Jouët 94700 Maisons-Alfort.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur le Docteur M. Thibier, Directeur du Laboratoire de Contrôle des Reproducteurs, qui a eu la gentillesse de m'accueillir dans son laboratoire.

J'exprime ma reconnaissance à Madame le Docteur B. Marquant-Le Guienne pour m'avoir acceptée dans son équipe de fécondation in vitro. Le travail qu'elle m'a confié n'aurait pu être mené à bien sans son assistance et ses conseils.

Je remercie vivement, Messieurs les Docteurs Gruvel, Chaboeuf et Chicoteau de l'IEMVT pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans la réalisation de ce travail.

Je remercie sincèrement Madame Nahon , qui a eu la gentillesse d'accepter de dactylographier le présent mémoire et les personnes de l'UNCEIA et de l'ACSEDIATE pour leur concours au bon déroulement de ce stage.

AVANT - PROPOS

Ce document rend compte de l'acquisition de la technique de fécondation in vitro, pratiquée au cours du stage réalisé dans le cadre du DESS de productions animales en régions chaudes. La partie expérimentale exposée sera précédée d'une revue bibliographique concernant cette technique.

Par ailleurs afin de situer le développement des biotechnologies dans le monde tropical, nous avons réalisé une enquête sur l'impact du transfert embryonnaire dans ces pays. Les résultats de cette étude font l'objet de la seconde partie du présent mémoire.

ERRATUM :

A la dactylographie la réponse du Dr M'Baye (Sénégal) a été involontairement omise. Celle-ci est rapportée à la page 49 bis. Nous vous prions de bien vouloir nous en excuser.

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE : FECONDATION IN VITRO CHEZ LES BOVINS

INTRODUCTION..... p. 1

Revue bibliographique

I. Collecte des ovocytes..... p. 2

A. Ponction in vivo

B. Ponction in vitro

II. Maturation des ovocytes..... p. 3

III. Capacitation du spermatozoïde..... p. 7

A. Capacitation et modifications membranaires

B. Techniques de capacitation in vitro

C. La réaction acrosomique

IV. Fécondation in vitro..... p. 12

A. Rappel des stades de la fécondation

B. Particularités de la fécondation in vitro

V. Culture de l'embryon..... p. 15

A. Culture in vivo sur hôte intermédiaire

B. Culture des embryons in vitro

Acquisition de la technique de fécondation in vitro

I. Matériel et méthodes..... p. 17

A. Fécondation in vitro avec du sperme congelé

1/ Maturation in vitro

2/ Fécondation in vitro avec du sperme congelé

B. Culture d'embryons fécondés in vitro

1/ Obtention d'une monocouche de cellules tubaires

2/ Repiquage ou mise en culture des oeufs fécondés

3/ Culture des embryons jusqu'au stade transférable

II. Présentation des résultats..... p. 22

A. Collecte des ovocytes

B. Maturation

C. Fécondation

D. Mise en culture des embryons

E. Premiers clivages

F. Obtention de blastocystes "toto in vitro"

G. Rendement global d'une manipulation de fécondation in vitro.

III. Discussion des résultats obtenus..... p. 29

Conclusion..... p. 34

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS D'UNE ENQUETE PONCTUELLE REALISEE SUR LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE DANS PAYS TROPICAUX.

INTRODUCTION..... p. 35

I. Interêt du transfert embryonnaire dans les pays tropicaux.. p. 39

A. Introduction d'un matériel génétique de choix

B. Constitution d'une banque de gènes

II. Réalisation actuelle du T.E. dans les pays tropicaux

Résultats d'enquête..... p. 41

A. Support de l'enquête

1. Questionnaire réalisé

2. Personnes interrogées

B. Résultats ..... p. 47

C. Discussion - Conclusion ..... p. 53

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... p. 55
(67 références)

PREMIÈRE PARTIE :

LA FÉCONDATION IN VITRO CHEZ LES BOVINS

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET ACQUISITION DE LA TECHNIQUE.

INTRODUCTION

L'essor que connaît actuellement la technique de fécondation in vitro tient au fait qu'elle permet non seulement l'augmentation du nombre d'embryons transférables (développement de la voie femelle) mais aussi le développement des biotechnologies actuellement à l'étude (Fukui et Ono, 1988). En effet, la production d'animaux transgéniques ou la multiplication in vitro de lignées supérieures dépendent directement de la production massive d'embryons à des stades précis de développement et de la culture in vitro de ceux-ci, afin d'atteindre un stade compatible avec leur transfert sur hôte définitif (First et Parrish, 1989). La technique de culture in vitro d'embryons manipulés (clônes, embryons transgéniques) permet de suivre leur développement jour après jour, sans subir les aléas de la remise en place sur hôte intermédiaire pour une culture in vivo (faible taux de collecte après culture : Eyestone et al, 1987a). La fécondation in vitro d'ovocytes, prélevés sur ovaires d'abattoirs, permet en outre la production, à prix réduit, d'un grand nombre d'embryons utilisables pour la recherche.

La mise au point de la technique de prélèvement d'ovocytes à un moment quelconque du cycle sexuel, permet aussi de pallier à certains cas d'abattage d'urgence de femelle de potentiel génétique élevé. En effet, en prélevant et fécondant des ovocytes, recueillis au moment de l'abattage, on pourra escompter produire encore quelques veaux après la mort de la femelle.

Enfin, en laboratoire, le développement de cette technique rendra possible le test de la fertilité potentielle de jeunes taureaux mis à la reproduction (corrélation fécondation in vitro-fécondation in vivo).

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. COLLECTE DES OVOCYTES

Il est possible de collecter des ovocytes par ponction selon deux techniques qui se différencient par le stade de maturation des ovocytes ainsi prélevés.

A. Ponction in vivo :

Cette technique est appliquée sur des ovaires de femelles superovulées, 24 à 30h après le début des chaleurs. Le prélèvement par voie chirurgicale (Brackett et al, 1981) ou endoscopique (Lambert et al, 1983, Sirard et Lambert, 1985; Lambert et al, 1986; Sirard et al, 1986 ; Stubbings et al, 1988 ; Schellander et al, 1989) consiste en une ponction des follicules pré-ovulatoires ou un lavage des oviductes, après l'ovulation. Dans les 2 cas, les ovocytes ainsi prélevés ont déjà subi une maturation intra-folliculaire et se caractérisent soit par un cumulus expansé (ovocyte pré-ovulatoire) soit par une absence de cellules périovocytaires (ovocyte ovulé,"nu").

De tels ovocytes, ponctionnés in vivo, peuvent être mis en fécondation directement par opposition aux ovocytes prélevés in vitro.

B. Ponction in vitro :

Cette technique s'applique à des ovaires de vaches abattues à un stade quelconque de leur cycle sexuel (prélèvement en abattoir).

La ponction de follicules de petit diamètre (1-7 mm) est effectuée soit par aspiration (Xu et al, 1986) soit par dissection et grattage de leur paroi interne (Iwasaki et al, 1987).

Certains follicules ponctionnés étant en phase de régression et dégénérescence (atrésie folliculaire), seuls les ovocytes présentant un cumulus compact et un cytoplasme uniformément granuleux sont sélectionnés pour l'étape de maturation in vitro (First et Parrish, 1987). A ce stade l'espace périvitellin des ovocytes est inexistant (Xu et al, 1986).

En moyenne, la ponction d'un ovaire permet d'obtenir une dizaine d'ovocytes dont un peu plus de la moitié seront mis en maturation (Iwasaki et al, 1987).

II. MATURATION DES OVOCYTES

Ponctionnés au niveau d'un follicule de petite taille, l'ovocyte est une cellule diploïde, bloquée au stade diplotène de la première division méiotique (prophase I, début de duplication des chromosomes). A ce stade, le noyau est appelé vésicule germinative.

In vivo, avant son expulsion (ovulation), l'ovocyte achève sa croissance et sa maturation , pour constituer le gamète femelle haploïde.

Cette maturation nucléaire ou transformation d'une cellule diploïde en une cellule haploïde est reportée sur le schéma n° 1. Elle résulte de l'achèvement de la première division méiotique, par l'émission du premier globule polaire et par l'initiation de la seconde division. Cette dernière ne s'achèvera qu'au cours de la fécondation et l'ovocyte mature restera ainsi bloqué au stade de métaphase II.

Ce seul aspect nucléaire est insuffisant pour rendre compte de la maturation de l'ovocyte. En effet, au cours de ce processus, l'ovocyte subit également une maturation cytoplasmique, impliquant l'acquisition d'un facteur de décondensation de la tête du spermatozoïde après la fécondation (Le Guienne , 1986). De façon plus générale, ces mécanismes relèvent de la synthèse de protéines régulant les évènements méïotiques, la décondensation du spermatozoïde, la formation de l'enveloppe du pronucléus mâle, l'initiation du clivage et la poursuite des segmentations ultérieures (First et Parrish, 1987).

In vivo, cette double maturation de l'ovocyte est directement dépendante des hormones gonadotropines endogènes FSH (Follicule Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone) qui induisent d'une part la reprise de la méiose (vésicule germinale → Met.II) et d'autre part le développement des cellules folliculaires. Ces dernières secrètent alors des oestrogènes principalement responsables, de la maturation cytoplasmique de l'ovocyte. (Le Guienne, 1986 ; First et Parrish, 1987 ; Thibault et Crozet, 1988).

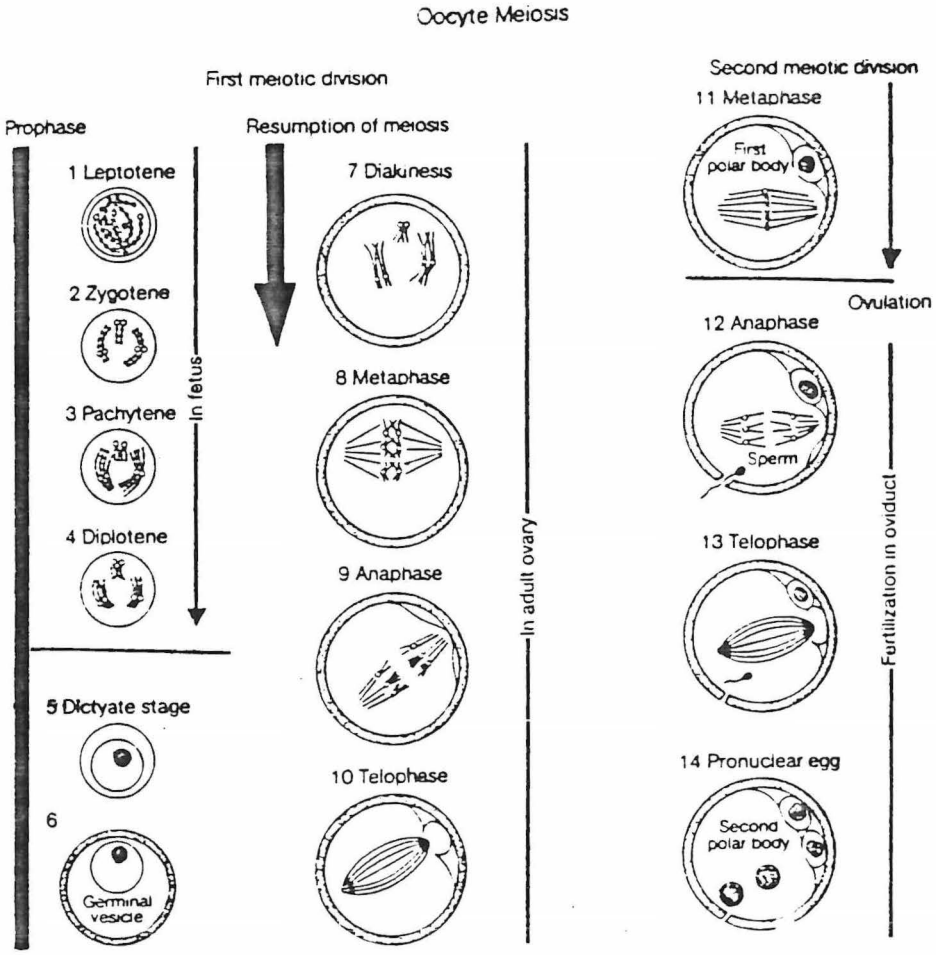


schéma n°1 : Les différents stades de la méiose. Pour plus de simplicité, uniquement 3 paires de chromosomes sont représentées. (1-4), Les 4 premiers stades de la prophase de la première division méiotique ont lieu pour la plupart des mammifères pendant la vie foetale. Le processus méiotique s'arrête au stade diplotène et l'ovocyte est bloqué au stade dictyotène (5-6). Quand la méiose reprend, la première division de maturation s'achève (7-11). L'ovulation a lieu habituellement au stade métaphase II (11) et la seconde division méiotique (12-14) se produit dans l'oviducte après la pénétration du spermatozoïde. (d'après Tsafriri, 1978)

On sait depuis plus de 50 ans que des ovocytes provenant de follicules à antrum reprennent spontanément leur méiose en culture comme le font les ovocytes dans les follicules préovulatoires (Thibault et Crozet, 1988). De tels ovocytes sont incapables cependant d'assurer correctement la prise en charge du génome paternel; il en résulte un arrêt plus ou moins précoce du développement embryonnaire. Ce sont les cellules de la granulosa qui dans le follicule préovulatoire permettent à l'ovocyte d'acquérir sa compétence cytoplasmique (Thibault et Crozet, 1988).

In vitro, il apparaît donc indispensable d'additionner d'une part des hormones gonadotrophiques et d'autre part des cellules folliculaires afin d'obtenir une maturation complète des ovocytes. La nature et la quantité des hormones et cellules à additionner diffèrent selon les auteurs. Ainsi, XU et al. (1986) ont montré que sans addition d'HCG (Hormone Chorionique Gonadotrophique) et de benzoate d'estradiol, le taux de maturation obtenu chutait de 79 à 49%. Par ailleurs d'autres auteurs ont observé que ce taux de maturation est identique que l'on apporte au milieu de maturation du sérum de veau feotal additionné de FSH, LH et oestradiol (en quantité connue) ou du sérum de vache en oestrus (Le Guienne et al. 1988; Thibault et Crozet, 1988).

L'influence de la présence des cellules du cumulus et de la granulosa a été étudié par Critser et al. (1986). Ces auteurs ont montré qu'en présence de complexes cumulus-ovocyte intacts, des ovocytes entourés de leur seule corona sont aptes au développement (obtention d'embryons viables après fécondation) tandis que dans les mêmes conditions des ovocytes dénudés ne peuvent suivre un tel développement. Ainsi non seulement le cumulus est impliqué, in vitro , dans la maturation des ovocytes, mais les cellules de la corona apparaissent aussi comme nécessaires (médiateurs de l'influence des cellules du cumulus, Critser et al, 1986).

Le temps nécessaire à la maturation in vitro, apprécié par l'expansion du cumulus de l'ovocyte, est compris entre 24 et 27 heures (First et Parrish , 1987). Xu et al. (1986) ont par ailleurs observé que les premiers globules polaires sont émis après 15 heures de culture des ovocytes, avec un pic d'émission vers 24 heures se prolongeant jusqu'à 30 heures. La connaissance de ces données nous amène à considérer, qu'in

vitro, l'ovocyte doit être cultivé pendant une période supérieure ou égale à 24 heures pour assurer sa maturation.

A la vue des résultats de développement embryonnaire obtenus in vitro (cf infra), il apparaît que la maturation de l'ovocyte est une étape initiale importante ; appréciée jusqu'ici par des critères morphologiques (expansion des cellules du cumulus). La définition de nouveaux paramètres (biochimiques, physiologiques, etc...) de maturation semble indispensable, pour permettre un meilleur contrôle de cette étape, par une sélection plus affinée des ovocytes jugés matures. A l'heure actuelle le problème posé reste la définition de tels critères (Leibfried-Rutledge, 1989).

III. CAPACITATION DU SPERMATOZOIDE

Les ultimes transformations subies par les spermatozoïdes se produisent dans les voies génitales femelles : c'est le processus de capacitation, qui correspond à la déstabilisation de leur membrane plasmique (Austin, 1951 ; Chang, 1951).

La modification des composants de la membrane plasmique du spermatozoïde est indispensable à l'activation de la mobilité et pour que la réaction acrosomique puisse se produire au contact de la zone pellucide de l'ovocyte.

Des changements ont lieu dans les parties de la membrane plasmique importantes pour la fécondation : région péri-acrosomique impliquée dans la rupture de l'acrosome, segment équatorial par où débutera la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte et le flagelle dont la fexibilité augmente lorsque le spermatozoïde est capacité (Thibault et Crozet, 1988) (Schéma n°2).

A/ Capacitation et modifications membranaires:

Les modifications moléculaires observées intéressent à la fois les protéines, les glucides et les lipides membranaires.

Des protéines de revêtement provenant de l'épididyme et des glandes annexes se détachent dans les voies génitales femelles, in vivo. Certaines de ces protéines, inhibitrices, empêchent en effet l'hypermobilité du flagelle, la réaction acrosomique et doivent être éliminées au cours de l'étape de capacitation in vitro. Les protéines les plus difficiles à détacher in vitro, sont celles provenant des glandes annexes; c'est pourquoi la capacitation des spermatozoïdes éjaculés est moins aisée à réaliser que celle des spermatozoïdes épidydimaires (First et Parrish, 1987).

Il existe une redistribution des glucides membranaires (glycolipides, glucides des chaînes protéiques, polysaccharides) au cours du processus de capacitation (Koehler, 1981 ; First et Parrish, 1987).

La fluidification de la membrane plasmique résulte d'une réduction du rapport cholestérol/phospholipides et d'une méthylation des phospholipides (First et Parrish, 1987).

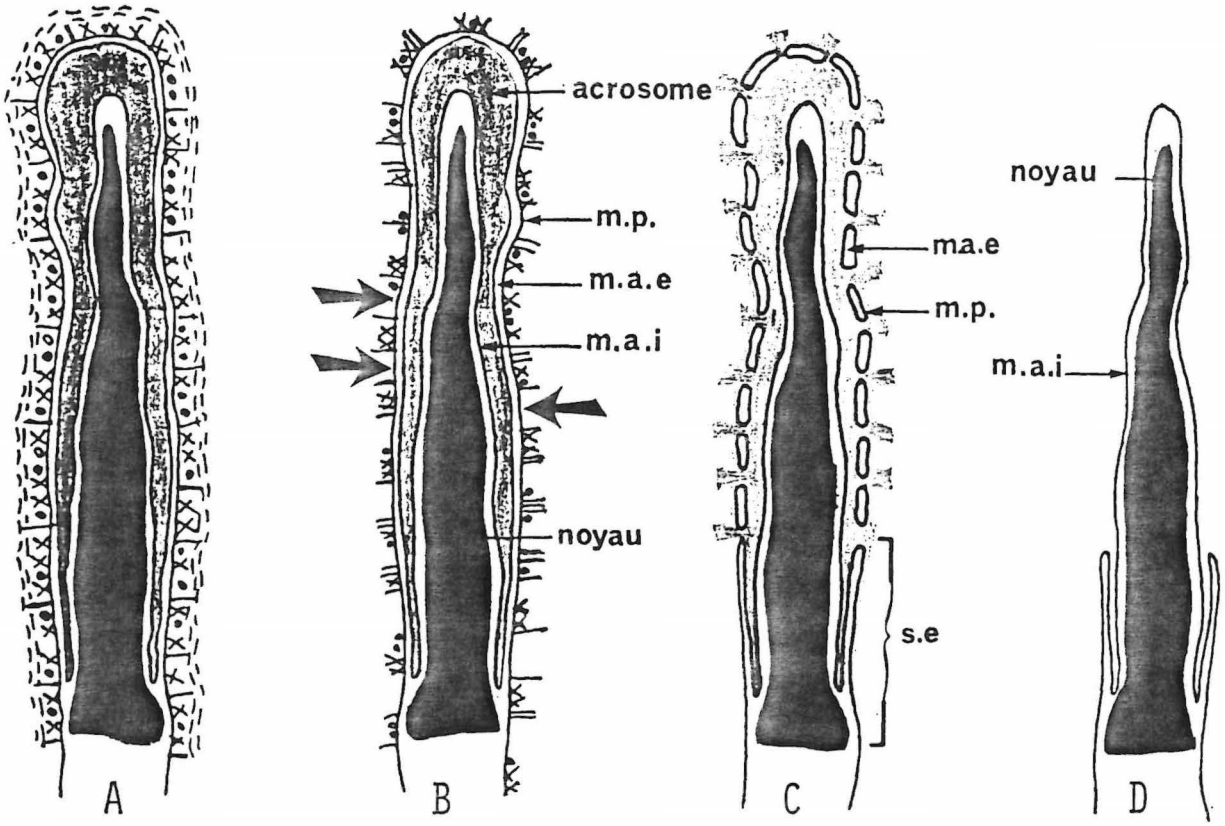


Schéma n° 2: LES DIFFÉRENTES PHASES SCHÉMATIQUES DE LA CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES

A. : SPERMATOZOÏDE ÉJACULÉ RECOUVERT DE PLASMA SÉMINAL, PRÉSENTANT UNE RÉPARTITION QUELCONQUE DES PHOSPHOLIPIDES (x), DES PARTICULES INTRAMEMBRANAIRES (I), DES ANTIGÈNES ET RÉCEPTEURS DIVERS (•)

B. : SPERMATOZOÏDE CAPACITÉ : APRÈS ÉLIMINATION DU PLASMA SÉMINAL ET RÉARRANGEMENT DES PHOSPHOLIPIDES, DES PARTICULES INTRAMEMBRANAIRES AINSI QUE DES ANTIGÈNES ET RÉCEPTEURS DIVERS, CERTAINES ZONES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE (→) SONT LIBRES ET SUPPOSÉES ÊTRE LES POINTS INITIAUX DE FUSION ENTRE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET LA MEMBRANE ACROSOMIQUE EXTERNE.

C. : SPERMATOZOÏDE EN COURS DE VÉSICULISATION LORS DE LA RÉACTION ACROSOMIQUE (R.A.) : LES ENZYMES ACROSOMIQUES SONT LIBÉRÉES DANS LE MILIEU ENVIRONNANT.

D. : SPERMATOZOÏDE APRÈS RÉACTION ACROSOMIQUE : LE SEGMENT ÉQUATORIAL(S.E.) EST DEMEURÉ INTACT, ALORS QUE DANS LA PARTIE ANTÉRIEURE DU SPERMATOZOÏDE, SEULE, LA MEMBRANE ACROSOMIQUE INTERNE DEMEURE.

Ainsi la capacitation est le résultat de différentes intéractions avec les composés du tractus génital femelle in vivo, ou du milieu de capacitation in vitro.

B/Techniques de capacitation in vitro:

Chez les bovins, différentes techniques de capacitation ont été proposées :

- incubation dans un milieu de force ionique élevée (HIS), supposé faciliter le détachement de protéines de revêtement (Brackett et Oliphant, 1975; Brackett et al., 1982).
- incubation longue de 18 à 24 heures (Wheeler et Seidel, 1986)
- incubation en présence de caféine (Goto et al., 1988).
- incubation en présence de lysophospholipides (Ehrenwald et al., 1988 ; Wheeler et Seidel, 1988).

La présence en abondance de glycosaminoglycans dans les voies génitales femelles a fait penser que leur introduction dans les milieux de capacitation, pourrait être considérée comme une intervention physiologique (Thibault et Crozet, 1988). Ainsi, l'effet favorable de l'héparine sur la capacitation a été confirmé par First et Parrish (1987, 1988), ses conditions optimales d'utilisation (concentration) devant être établies pour chaque taureau testé voire chaque éjaculat (First et Parrish, 1987 ; Le Guienne et al, 1988). Son mode d'action reste toutefois inconnu (Le Guienne et al., 1988).

La mise au point d'un milieu de capacitation est d'autant plus difficile qu'il s'agit de maintenir un nombre suffisant de spermatozoïdes vivants et très mobiles ; ceci est particulièrement vrai pour le sperme congelé de taureaux (Thibault et Crozet, 1988). A cette fin, de nombreux auteurs enrichissent ce milieu avec de l'hypotaurine et de la noradrénaline (facteurs de mobilité) (Le Guienne et al, 1988).

Il n'existe toutefois aucune homogénéité dans la composition des milieux de capacitation, établis selon les auteurs, ce qui suggère la persistance de facteurs non contrôlés qui conduisent à une non répétabilité des résultats.

C/ La réaction acrosomique:

La réaction acrosomique est le résultat de la fusion des membranes plasmique et acrosomique externe, accompagnée de la formation de vésicules entourant la tête du spermatozoïde (Schéma n° 3, Wassarman, 1989). Cette réaction est calcium dépendante.

La réaction acrosomique possède au moins deux fonctions biologiques :

- la libération des enzymes permettant le franchissement des membranes ovocytaires.
- la modification physiologique de la membrane plasmique recouvrant le segment équatorial et/ou la région post-acrosomique ; rendant cette membrane capable de fusionner avec la membrane plasmique de l'ovocyte.

En conclusion, nous retiendrons que seul le spermatozoïde capacité est capable d'effectuer sa réaction acrosomique au contact de la zone pellucide de l'ovocyte (Wassarman, 1987) : ultime étape de sa maturation avant la fécondation proprement dite.

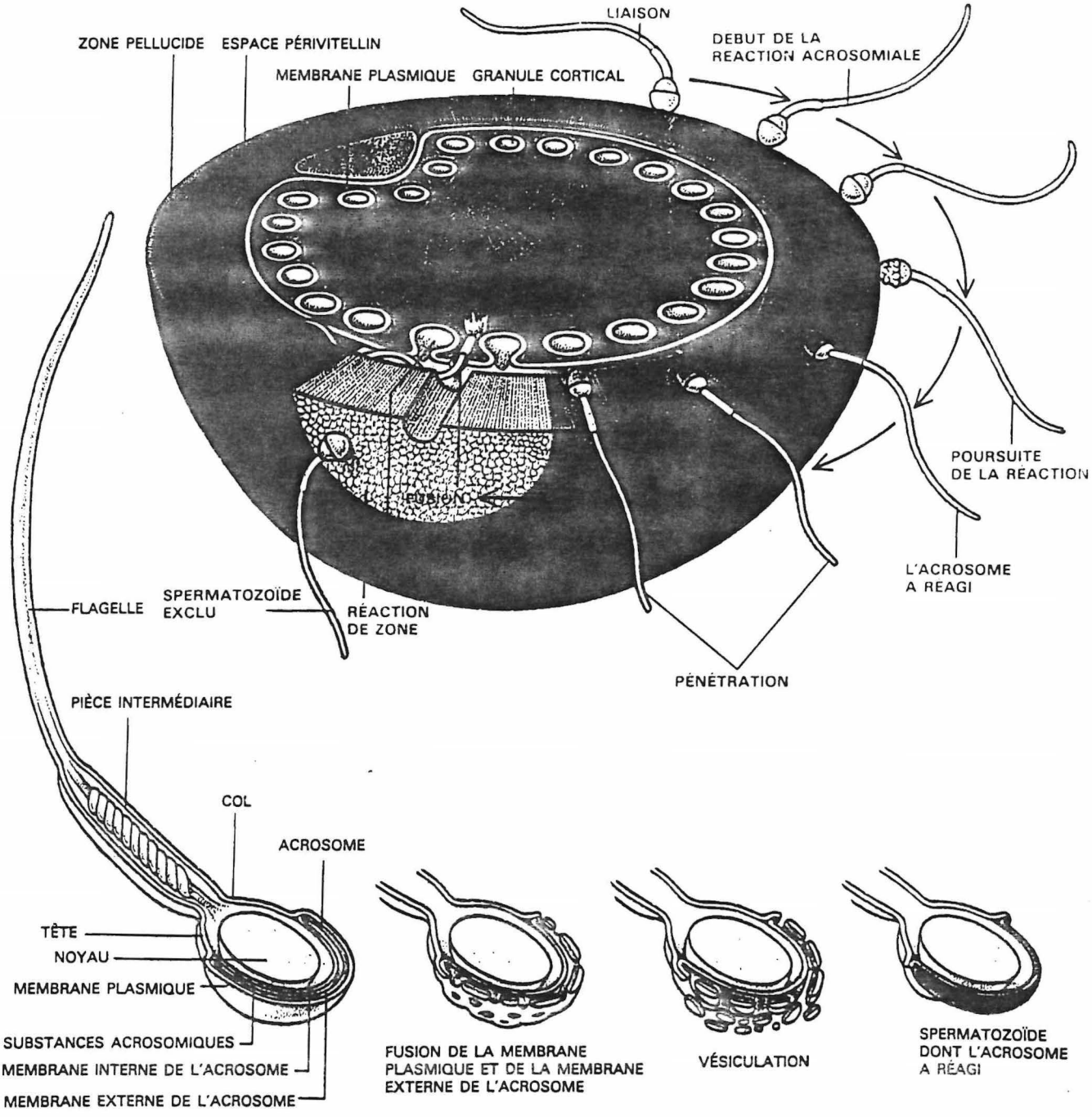


Schéma n°3 : La réaction acrosomique (Wassarman, 1989).

IV. FECONDATION IN VITRO

A/ Rappel des stades de la fécondation:

Le schéma n°4 rapporte les différentes étapes de la fécondation (Thibault, 1967).

- Stade 0 : passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide.

- Stade 1 : accolement à la membrane cytoplasmique et activation de l'oeuf. Les granules corticaux déversent alors leur contenu dans l'espace périvitellin, ce qui constitue un des moyens de blocage de la polyspermie.

- Stade 2 : début de décondensation de la tête du spermatozoïde, migration des chromosomes femelles aux deux pôles du fuseau de maturation et émission du second globule polaire.

- Stade 3 : fin de décondensation de la tête du spermatozoïde et formation des deux pronucléi.

- Stade 4 : migration des deux pronucléi, l'un vers l'autre, au centre de l'ovocyte.

- Stade 5 : accolement des deux pronucléi, condensation des deux jeux de chromosomes pour former la plaque métaphasique de la première division de segmentation de l'oeuf fécondé.

La durée de ces phénomènes est variable selon l'espèce considérée: 20 à 24 heures chez la vache (ovulation - première division de segmentation; Thibault, 1967).

B/ Particularités de la fécondation in vitro :

La fécondation in vitro ne fait pas appel aux mêmes mécanismes qu'in vivo, pour s'en convaincre il suffit de comparer le nombre de

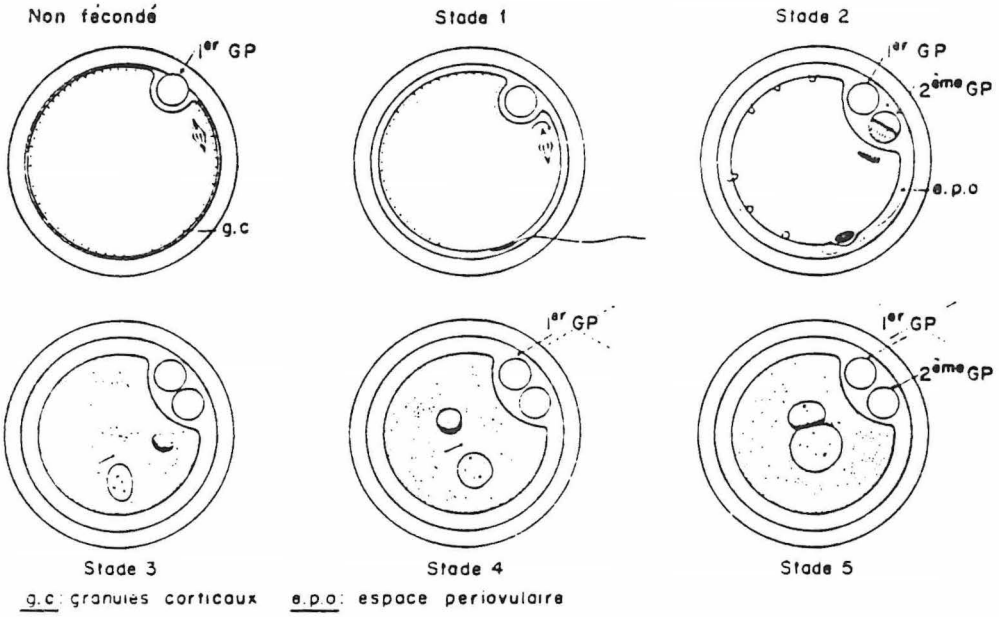


Schéma n°4 : Les 5 stades de la fécondation, d'après THIBAULT (1967)

spermatozoïdes présents dans l'ampoule tubaire au moment de la fécondation et le nombre , 10 000 et 100 000 fois plus élevé, nécessaire in vitro (Thibault et Gérard, 1987).

L'un des facteurs déterminant pour le succès de la fécondation in vitro est le respect des températures existant in vivo. Ainsi le maintien des milieux à une température voisine de 39°C est une nécessité absolue chez les bovins. (First et Parrish, 1987; Thibault et Crozet, 1988).

Pour des raisons de commodité, la fécondation n'est souvent contrôlée que 15 heures ou plus après l'insémination, de telle sorte que le moment de la pénétration n'est pas connu. L'examen de la taille et de la place des pronucléi dans l'oeuf de vache indique que les fécondations sont souvent tardives (Thibault et Crozet, 1988). Ainsi Hyttel et al. (1988) ont observé l'émission du deuxième globule polaire aux environs de la huitième heure après la mise en présence des gamètes mâles et femelles.

Il semble que dans les techniques usuelles de fécondation in vitro, chez les bovins, la présence des cellules du cumulus ou au moins de la corona radiata est une nécessité (Marquant- Leguienne et al., 1988). La question étant de savoir si la capacitation n'a pas lieu spontanément au contact des cellules du cumulus (Thibault et Crozet, 1988).

Pour la fécondation in vitro, comme pour la capacitation étudiée précédemment, la composition des milieux utilisés varient selon les auteurs ; les plus utilisés étant le milieu de Brackett et le TALP (Tyrode modifié).

V. CULTURE DE L'EMBRYON

Le replacement des oeufs fécondés peut s'effectuer chez la vache, par voie transcervicale, sans intervention chirurgicale. Le taux de succès est supérieur lorsque l'âge de l'embryon et celui de l'utérus, compté à partir du moment de l'ovulation, sont synchronisés. Or physiologiquement au cours de sa progression dans les voies génitales, l'embryon ne pénètre dans la cavité utérine qu'après 5 à 6 jours de développement. L'utilisation des oeufs fécondés in vitro nécessite donc une culture de plusieurs jours avant le transfert.

Malheureusement les oeufs fécondés de vache n'effectuent le plus souvent que 2 à 3 cycles de division cellulaire, quel que soit le milieu de culture (Massip et al, 1983 ; Eyestone et al, 1987b; Thibault et Crozet, 1988).

A/Culture in vivo sur hôte intermédiaire:

Afin d'éviter ce blocage in vitro de l'embryon bovin au stade 8 - 16 cellules, de nombreux auteurs utilisent une technique de transfert chirurgical dans les oviductes d'un hôte intermédiaire.

Cette technique permet d'obtenir un taux appréciable d'embryons à un stade transférable par voie cervicale sur l'hôte définitif.

Les différents hôtes intermédiaires utilisés sont :

- la lapine (Sirard et al, 1985 ; Sirard et Lambert, 1986 ; Lambert et al, 1986; Ectors et al, 1988 ; Fukui et Ono, 1988 ; Utsumi et al., 1988).
- la brebis (Critser et al, 1986 ; Eyestone et al, 1987 a ; Lu et al, 1989).
- la génisse (Brackett et al, 1981, 1982 ; Sirard et Lambert, 1986 ; Fayrer-Hosken et al, 1989 ; Greve et al, 1989).

Toutefois une telle méthode s'avère coûteuse et nécessite de nombreuses manipulations embryonnaires . De plus, le taux de collecte des embryons après culture in vivo avoisine rarement les 100% (Eyestone et al, 1987 a). C'est pourquoi les recherches actuelles s'orientent vers le développement de systèmes de co-culture in vitro.

B/Culture des embryons in vitro:

Le problème principal de la mise au point d'un tel système de culture repose sur le fait qu'en l'état actuel des connaissances, les besoins requis par l'embryon pour assurer son développement in vitro n'ont pu être définis (Caird, 1989).

Les premiers travaux de Gandolfi et Moor (1987) de co-culture sur monocouche de fibroblastes et de cellules tubaires, ont été le point de départ des recherches actuelles. Eyestone et al (1987b) ont montré qu'un facteur biologique contenu ou secrété par les cellules épithéliales tubaires (culture en présence de cellules ou en milieu conditionné) permettait de poursuivre le développement embryonnaire au delà du stade de blocage classique. A ce jour, ce facteur n'a pas encore été isolé.

Par ailleurs la présence dans le milieu de culture de vésicules trophoblastiques (Heyman et Ménézo, 1987 ; Aoyagi et al., 1989), de cellules du sac amniotique (Aoyagi et al, 1989) ou cellules folliculaires (Kajihara et al, 1987) a permis d'augmenter le taux de développement des embryons ainsi cultivés.

A l'heure actuelle les conditions de culture in vitro des embryons bovins ne sont pas optimales, ceci est en partie lié au fait que la cause du blocage du développement embryonnaire reste encore inconnue. La mise au point d'un système de co-culture fait l'objet de nombreuses recherches et les auteurs s'orientent principalement vers l'utilisation des cellules épithéliales tubaires, un tel système semble en effet prometteur (First et Parrish, 1987, Thibault et Crozet, 1988).

ACQUISITION DE LA TECHNIQUE DE FECONDATION IN VITRO

Il sera rendu compte de cette acquisition de connaissances, par une présentation du déroulement des différentes étapes de la technique et de données chiffrées relatives aux manipulations effectuées, qui précèderont une discussion des résultats obtenus par rapport aux publications étudiées.

I./ Matériel et méthodes :

Les différentes étapes de la technique sont résumées chronologiquement sur le schéma n° 5.

A/ Fécondation in vitro avec du sperme congelé:

1) Maturation in vitro :

Collecte des ovocytes

La collecte des ovocytes est réalisée à partir d'ovaires provenant d'un abattoir. Ceux-ci sont réceptionnés au moment de l'éviscération, désinfectés et transportés dans un milieu de collecte (PBS + 2 g/l albumine bovine) à une température de 35-38°C.

Dès le retour au laboratoire les follicules visibles à la surface de l'ovaire sont ponctionnés, selon une technique manuelle simple, d'aspiration du liquide folliculaire, des follicules d'un diamètre compris entre 2 et 7 millimètres.

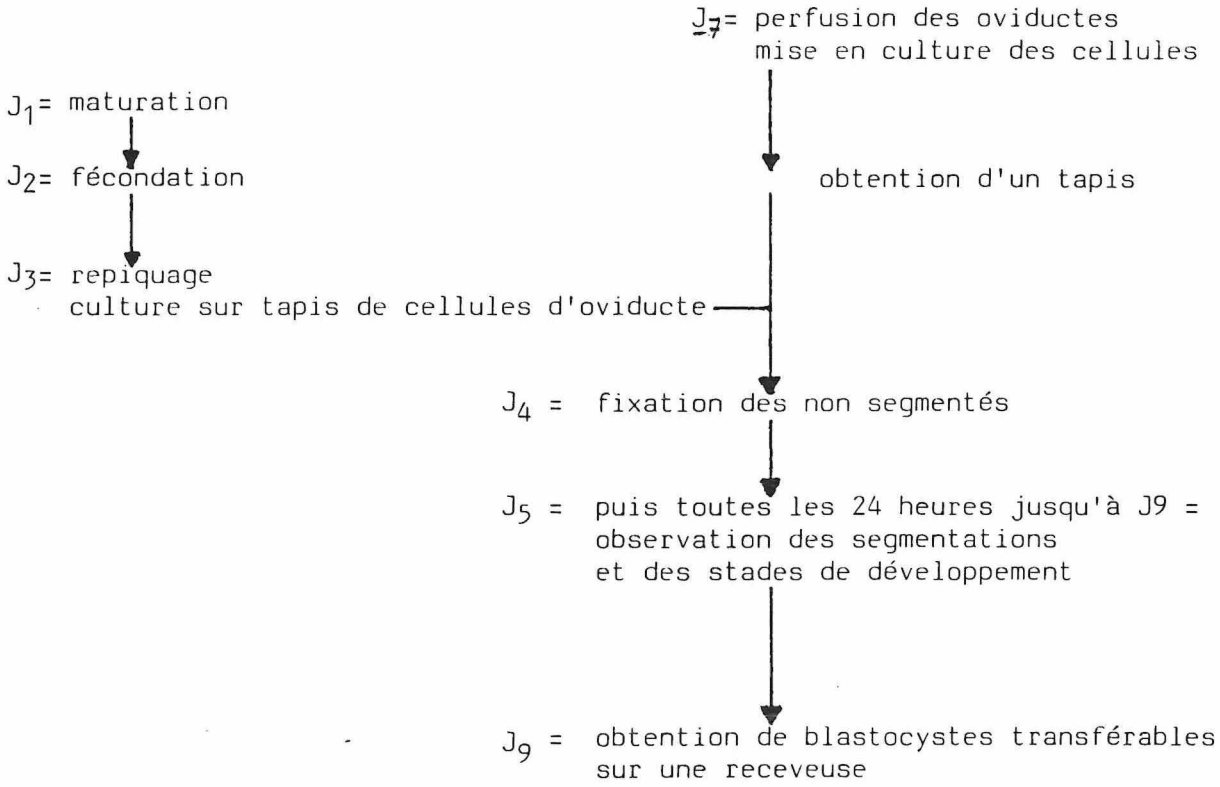
Le contenu folliculaire est alors déposé dans un tube conique.

Recherche des ovocytes

Les ovocytes sont recherchés dans le culot de sédimentation, à l'aide d'une loupe binocculaire, puis lavés dans le milieu de maturation avant la mise en culture. Le milieu de maturation est constitué de M199 additionné de 20% de serum de veau foetal, ainsi que de 10 µg/ml de FSH/LH (Burns-biotec) et 1 µg /ml d'oestradiol 17β (Sigma) (Fukui et al, 1982 ; Aoyogi et al, 1988).

Cette recherche des ovocytes comporte également une étape de tri, qui

Schéma nº 5 : Chronologie des différentes étapes in vitro



vise à éliminer les ovocytes jugés inaptes à la maturation (ovocytes atrétiques, ovocytes nus...).

Préparation des cellules de la granulosa

Les cellules de la granulosa, en suspension dans le liquide folliculaire, sont centrifugées. Lavées trois fois dans le milieu de maturation, elles sont ensuite cultivées à une concentration de 1 à 5 x 10^6 /ml avec les ovocytes.

La maturation est ainsi réalisée en 24 à 26 heures à 39°C, sous une atmosphère contrôlée de 5% CO2 mélangé à l'air.

2. Fécondation in vitro avec du sperme congelé:

Préparation des spermatozoïdes

Après décongélation du sperme, les spermatozoïdes les plus mobiles sont sélectionnés par migration ascendante, dans un milieu de Tyrode modifié.

Après dénombrement et dilution, le nombre de spermatozoïdes est ramené à une concentration de 1 x 10^6 /ml de milieu de fécondation.

Préparation des ovocytes et fécondation

Après maturation les ovocytes sont rinçés deux fois , dans un milieu de Tyrode additionné de lactate, pyruvate et albumine (milieu de fécondation), puis incubés 18 heures à 39°C en présence des spermatozoïdes.

Au cours de cette manipulation des ovocytes, une nouvelle sélection est établie permettant de ne soumettre à la fécondation que les ovocytes présentant un cumulus expansé (critère morphologique d'appréciation de la maturation).

B/ Culture d'embryons fécondés in vitro :

1/ Obtention d'une monocouche de cellules tubaires :

La culture et l'entretien des tapis cellulaires comportent différentes étapes, réalisées en concomitance avec les étapes de la fécondation in vitro, précédemment décrites.

Toutefois il existe un certain délai entre l'obtention des cellules tubaires et leur utilisation à des fins de culture embryonnaire. D'où la nécessité d'entretenir en permanence des cultures de cellules d'oviducte, disponibles le jour du repiquage des oeufs fécondés.

Au jour de la collecte, plusieurs oviductes sont également amenés des abattoirs, disséqués et perfusés, afin d'obtenir des suspensions de cellules épithéliales. Ces cellules sont alors mises en culture dans le milieu B2 Ménézo (Inra), additionné de 10% de sérum de veau foetal et d'antibiotiques.

Dans le cadre de notre expérimentation, cette opération a été réalisée aux jours 1 et 2 de la manipulation (schéma n° 5), correspondant à la double visite d'abattoir effectuée chaque semaine.

Le développement des tapis cellulaires est observé régulièrement ; tandis que le milieu d'entretien est changé tous les trois jours.

2. Repiquage ou mise en culture des oeufs fécondés :

Les oeufs prélevés des tubes de fécondation sont alors décoronisés ; ceci consiste en une élimination des cellules de la corona ainsi que des spermatozoïdes surnuméraires. Ceux-ci sont ensuite mis en culture sur une monocouche de cellules épithéliales tubaires, dans le milieu B2 Ménézo (INRA) enrichi, précédemment cité.

3. Culture des embryons jusqu'au stade transférable :

Les premières 24 heures de culture permettent une discrimination de la segmentation embryonnaire ; c'est à ce moment que le calcul du taux de segmentation est effectué.

Au terme de ces premières heures les oeufs non segmentés sont fixés,

en vue d'établir un calcul du taux de fécondation. Cette fixation est réalisée selon la méthode décrite par Brackett (1982), dans un mélange acide acétique-éthanol (1:3 v/v) et permet de visualiser, sous observation microscopique, les pronucléi présents dans les oeufs non segmentés.

Les embryons ainsi mis en culture sont observés toutes les 24 heures, afin d'apprécier leur stade de développement.

II/ Présentation des résultats:

L'ensemble des données chiffrées résultant de treize manipulations, réalisées personnellement, est rapporté au tableau n° 1.

A/ Collecte des ovocytes:

La ponction de petits follicules situés en surface des ovaires selon la méthode décrite, permet l'obtention moyenne de 11 ovocytes par ovaire, dont 8 seront jugés aptes à la maturation.

La sélection opérée repose sur l'élimination des ovocytes nus et atrétiques (cumulus expansé, comportant de nombreuses cellules pycnotiques).

B/ Maturation:

Le rendement de la maturation n'a pu être calculé que sur six manipulations (cf tableau n° 1 ; manipulations n°s 1,2,9,10,12 et 13) pour lesquelles 337 ovocytes, sur 378 mis à maturer, furent soumis à la fécondation. Le taux de maturation peut donc être estimé à 89%.

C/ Fécondation:

La fécondation s'apprécie d'une part par le taux de segmentation et d'autre part par les résultats d'observation des pronucléi, sur zygotes fixés.

Cette étude fut réalisée avec le sperme de quatre taureaux différents et les données sont rapportées au tableau n°2.

Le taux moyen de fécondation est de 69,5%. Les extrêmes allant de 59,5% pour le taureau A à 75,8% pour le taureau D.

D/ Mise en culture des embryons:

Nous présentons ici le taux d'embryons mis en culture après fécondation (i.e. embryons repiqués).

L'estimation du rendement de cette étape et des difficultés techniques rencontrées, est faite sur le résultat de six manipulations (cf tableau n° 1, manipulations, n°s 1,2,9,10, 12 et 13).

Tableau n°1 : Tableau récapitulatif des données chiffrées obtenues sur un ensemble de treize manipulations :

Manipulation N°=	Nb d'ovocytes mis en matu.	Nb d'ovocytes mis en FIV	Nb d'oeufs mis en cult.	Nb d'embryons segmentés (48h post FIV)
1	55	43	41	2
2	49	45	41	2
3	91	ND	67	ND
4	258	ND	207	87
5	167	ND	127	73
6	155	ND	96	ND
7	39	ND	26	16
8	39	ND	32	17
9	59	54	37	12
10	68	61	51	18
11	93	ND	77	42
12	49	45	41	20
13	98	89	82	46
Total	1220	ND	925	ND

NB : ND = Donnée non déterminée

Tableau 2 : Taux de fécondation obtenus, in vitro, avec du sperme congelé provenant de quatre taureaux différents.

Taureau testé	Nombre d'ovocytes inséminés	Taux de fécondation obtenu
A	42	59,5% (25/42)
B	25	64% (16/25)
C	38	68,4% (26/38)
D	95	75,8% (72/95)
Moyenne	n = 200	69,5% (139/200)

NB: Taux de fécondation = $\frac{\text{Nb d'embryons segmentés + Nb d'ovocytes non segmentés ayant 2 PN*}}{\text{Nb d'ovocytes inséminés}}$

* PN : pronuclei

Le taux d'embryons repiqués se définit comme le rapport du nombre d'embryons mis en culture et du nombre d'ovocytes soumis à la fécondation (r = 293/337), égal à 86,9% dans le cas de notre étude.

E/ Premiers clivages:

Une estimation, établie sur onze manipulations (cf tableau n°1, exception faite des manipulations 3 et 6), du taux de segmentation peut se faire par le calcul du rapport du nombre d'embryons segmentés et du nombre d'embryons repiqués. Cette estimation est de 44% (r = 335/762).

Par ailleurs, une étude comparative du taux de segmentation obtenu in vitro, a été effectuée avec le sperme congelé de quatre taureaux différents. Les variations de ce taux en fonction du mâle testé sont rapportées dans le tableau 3. Ainsi l'estimation globale de 44% (tous taureaux confondus) est-elle comprise entre les valeurs extrêmes de 18,9% et 62,1% pour les taureaux B et D respectivement.

F/ Obtention de blastocystes "toto in vitro":

Les manipulations ayant permis l'obtention d'embryons au stade blastocyste (stade transférable) sont rapportées au tableau n°4.

Le développement in vitro peut s'apprécier par le rapport du nombre de blastocystes obtenus et du nombre d'embryons segmentés. Notre rapport s'établit à 9,9% (x = 15/151).

G/ Rendement global d'une manipulation de fécondation in vitro:

L'ensemble des différents rendements calculés précédemment est rapporté sur le schéma n° 6.

Ainsi sur 100 ovocytes mis à maturer, la technique utilisée nous a permis d'obtenir une moyenne de 3 blastocystes.

Tableau n°3 : Taux de segmentation obtenus, in vitro, avec du sperme congelé provenant de quatre taureaux différents

Taureau testé	Nombre d'oeufs repiqués	Taux de segmentation obtenu
A	110	56,4% (62/110)
B	111	18,9% (21/111)
C	38	39,5% (15/38)
D	95	62,1% (59/95)
Moyenne	n = 354	44,3% (157/354)

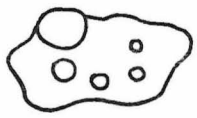
NB : Taux de segmentation = $\frac{\text{Nombre d'embryons segmentés}}{\text{Nombre d'oeufs repiqués}}$

Tableau n° 4 : Résultats des manipulations ayant permis l'obtention d'embryons au stade blastocyste.

Manipulation N°	Nb d'embryons segmentés	Nb de blastocystes obtenus
5	73	5
7	16	3
11	42	5
12	20	2
Total	151	15

NB : Nous avons aussi obtenu 4 blastocystes au cours de la manipulation n°6. Ceux-ci n'ont toutefois pas été pris en considération, car le nombre d'embryons segmentés s'y rapportant est non déterminé.

Schéma n° 6 : Rendement des différentes étapes in vitro



1 ovaire → 8 ovocytes

MATURATION — 100 ovocytes

r = 89%

FECONDATION — 89

Taux de FIV = 69,5%
- Estimation -
[59,5 - 75,8]

r = 86,9%

MISE EN CULTURE — 77

r = 44%
[18,9-62,1]

SEGMENTATION — 34

r = 9,9%

OBTENTION DE STADES TRANSFERABLES — 3 blastocystes

III. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS :

Nous discuterons les résultats obtenus au cours de nos différentes manipulations, à partir du tableau n° 5, réalisé après consultation de documents bibliographiques.

La difficulté rencontrée dans l'analyse de ces données réside dans le fait que de nombreuses publications ne permettent pas de connaître avec exactitude la technique utilisée ni les rendements obtenus pour chacune des étapes.

La multiplicité des milieux choisis et des techniques utilisées selon les différents auteurs, facilite d'autant moins la comparaison des résultats obtenus. Aussi n'avons nous retenu que quelques articles, exposant une technique proche de celle que nous avons utilisée, à savoir :

- maturation de l'ovocyte in vitro
- fécondation in vitro
- culture de l'embryon in vitro

Obtention et sélection des ovocytes

La collecte des ovocytes nous a fourni 8/11 (72,7%) ovocytes estimés de bonne qualité ; cette valeur quelque peu supérieure à celle rapportée par Iwasaki et al., (1987) nous laisse supposer que cet auteur avait établi une sélection plus sévère des ovocytes. Rappelons que nous ne disposons à l'heure actuelle que des critères d'appréciation morphologiques qui, à l'évidence, sont très subjectifs.

Taux de maturation

Le taux moyen de maturation obtenu au cours de notre expérimentation est de 89%. Cette valeur moyenne concorde avec les données bibliographiques recueillies, pour lesquelles les extrêmes vont de 70,9% (Fukui et al, 1989) à 95% (Ectors et al, 1988). Là encore les critères d'appréciation de l'ovocyte mature se fondant sur ses caractères morphologiques, la concordance des résultats nous permet de conclure que notre sélection des ovocytes à inséminer (ovocytes jugés

Tableau n°5 : Données bibliographiques de résultats obtenus pour la technique de fécondation ("toto in vitro").

Collecte des ovocytes	Iwasaki et al, 1988	9,4 ovocytes/ovaire 5,3 ovocytes jugés de bonne qualité (56,4%
Taux de maturation	Ectors etal, 1988	95%
	First et Parrish, 1987	80%
	Fukui et al, 1989	70,9%
	Iwasaki et al, 1987	81,1%
	Le Guienne et al, 1988	90,0%
Taux de fécondation	Berg et Brem, 1989	68%
	Ectors et al, 1988	78%
	Fukui et al, 1989	67,1%
	Iwasaki et al, 1987	63,3%
	Marquant-Le Guienne et al, 1990	36,8% à 87%
Taux de segmentation	Ectors et al, 1988	74,4%
	Le Guienne et al, 1988	76%
Taux d'embryons stades transférables	Berg et Brem, 1989	2% Blastocyste
	Fukui et Ono, 1988 et Fukui et al, 1989	12,3% Morula et Blastocyst
	Kajihara et al, 1987	4,1 à 25,4% Blastocyste 2,1 à 3,7% Blastocyste sorti de zone pellucide.

matures a été bien établie.

Taux de fécondation

L'estimation de notre taux de fécondation à 69,5% s'inscrit dans l'intervalle de valeurs données par différents auteurs ; allant de 36,8% (Marquant - Le Guienne et al, 1990) à 78% (Ectors et al, 1988).

Un tel résultat nous permet de conclure au bon déroulement des premières étapes (maturation, capacitation et fécondation) de notre expérimentation.

La variabilité du taux de fécondation annoncée par Marquant-Le Guienne et al. (1990) rend compte de l'effet de la concentration d'héparine utilisée pour la capacitation mais aussi et surtout de la variation des résultats en fonction du taureau utilisé. Nous avons nous-même mis en évidence ces fluctuations au cours de notre expérimentation. Rappelons en effet que le taux de fécondation estimé varie de 59,5% à 75,8% en fonction du taureau que nous avons testé.

Mise en culture des embryons

De façon générale la littérature ne fournit aucune valeur chiffrée relative aux taux d'embryons repiqués. En effet celui-ci ne reflète pas directement une étape particulière mais plutôt une dextérité à la manipulation.

Ce taux met en évidence une difficulté de la technique dans son ensemble qui réside dans le transport des ovocytes, oeufs ou embryons d'un puits de culture à l'autre, selon l'étape en question (maturation, fécondation, culture). Un tel rendement peut donc être calculé après chaque étape décisive de la technique.

Néanmoins le succès de l'ensemble des manipulations réalisées dépend également d'un facteur temps. Ainsi la rapidité avec laquelle sont effectués les transferts dans les différents milieux, influence considérablement les résultats obtenus. C'est pourquoi , afin de limiter l'allongement du temps de manipulation, dû à notre apprentissage de la technique, certaines valeurs intermédiaires du nombre d'ovocytes, oeufs ou embryons manipulés n'ont pu être déterminées. Nous considèrerons donc le taux d'embryons repiqués, comme une illustration représentative des différentes pertes embryonnaires occasionnées par la manipulation.

Pour un manipulateur expérimenté un tel taux avoisine les 100%, dans notre cas nous considérons qu'un résultat de 86,9% est tout à fait acceptable et encourageant.

Taux de segmentation

L'étude bibliographique réalisée rapporte un taux de segmentation voisin de 75% (74,4% Ectors et al, 1988 ; 76% Le Guienne et al, 1988). Dans notre expérimentation ce taux n'est que de 44%, allant de 18,9% à 62,1%.

Ce résultat inférieur à ceux des auteurs cités, ne doit pas nous surprendre. Les données bibliographiques retenues sont le fait d'expérimentations ayant permis l'obtention d'un taux de fécondation voisin de 80%. Ce résultat supérieur à celui que nous avons pu nous même enregistrer, (69,5%), conduit logiquement à un meilleur taux de segmentation embryonnaire.

Au demeurant, les taureaux testés dans le cadre de notre expérimentation, n'ont fait l'objet d'aucune étude in vitro préliminaire, qui aurait permis la sélection des meilleurs d'entre eux.

Obtention de blastocystes "toto in vitro"

Le fait d'avoir obtenu quelques blastocystes au cours de notre expérimentation est très encourageant ; en effet ce stade rend compte du développement total in vitro et représente le stade transférable sur hôte définitif.

Après le blocage 8-16 cellules, précedemment décrit la compaction de la morula, précédant la formation du blastocyste, constitue également une étape critique du développement in vitro. Ainsi pour notre expérimentation, le nombre de morulae observées est de 27. Or ceci est une valeur minimale puisqu'il ne nous a pas été possible de suivre tous les stades de développement pour chacune des manipulations entreprises.

Ainsi le taux de développement in vitro donné par le nombre de morulae et blastocystes obtenus (sans distinction) est généralement appréciable (Fukui et Ono, 1988 ; Fukui et al, 1989), mais ne rend pas compte de l'arrêt de développement survenant parfois lors de la compaction de la morula. A l'inverse, la communication du seul nombre de blastocystes obtenus in vitro

fournit une estimation plus exacte du rendement final de la technique (Kajihara et al, 1987; Berg et Brem, 1989).

De tous les rendements d'étapes calculés (cf. schéma n°6) celui-ci est le plus faible et souligne donc les problèmes actuellement rencontrés dans la culture de l'embryon bovin in vitro. A ce titre les investigations doivent être poursuivies et notamment centrées sur la maturation de l'ovocyte et les premiers stades de division.

En effet, les données recueillies chez la souris montrent que certaines synthèses protéiques dans l'ovocyte interviennent aussi dans des évènements plus tardifs comme probablement la formation du blastocyste (Renard, 1989). Peut-être en est-il de même pour l'embryon de bovin, la question reste entière aujourd'hui mais trouvera une réponse dans un avenir proche avec l'avancement des connaissances actuelles.

CONCLUSION

La fécondation in vitro des ovocytes de bovins est maintenant entrée dans la routine de nombreux laboratoires mais les taux de succès varient encore de manière imprévisible.

La naissance du premier veau issu de fécondation in vitro fut rapportée par Brackett et al. (1982). Depuis quelques naissances et gestations ont été obtenues, principalement par utilisation de la culture in vivo sur hôte intermédiaire (Sirard et al, 1985 ; Sirard et Lambert, 1986 ; Crister et al, 1986 ; Xu et al, 1987 ; Goto et al, 1988 ; Utsumi et al, 1988 ; Greve et al, 1989 ; Fayrer-Hosken, 1989). Mais ces premiers résultats ne doivent pas cacher qu'il reste de nombreuses connaissances à acquérir avant de passer à l'application de cette technique.

La multiplicité des milieux proposés et les avantages attribués temporairement à tel ou tel composant tiennent à l'existence de facteurs non contrôlés et de mécanimes encore inconnus. L'accroissement des connaissances actuelles permettra à l'avenir une homogénéisation des procédés et une répétabilité des résultats, qui feront de cette technique un mode de reproduction complémentaire de l'insémination artificielle et du transfert embryonnaire.

La fécondation in vitro étant d'ores et déjà sujet de recherches appliquées aux espèces tropicales (buffle d'eau : Singh et al, 1989), il nous est apparu intéressant de nous interroger sur l'application actuelle des techniques modernes de reproduction dans les pays tropicaux. Ceci fait l'objet de la suite du présent mémoire.

DEUXIÈME PARTIE :

RÉSULTATS D'UNE ENQUÊTE PONCTUELLE RÉALISÉE SUR LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE DANS LES PAYS TROPICAUX.

(JUIN 89 ⟶ SEPT 89)

INTRODUCTION

Le transfert embryonnaire est une technique moderne de reproduction envisageable chez de nombreuses espèces de Mammifères domestiques et sauvages, qui s'est particulièrement développée depuis quelques années chez les bovins.

La situation actuelle du transfert embryonnaire au niveau mondial et européen est rapportée dans les tableaux N° 6 et 7 .

Ces premières données chiffrées nous permettent de constater l'existence d'une véritable industrie du transfert embryonnaire, en Amérique du Nord et en Europe (≃200 000 transferts/an au niveau mondial, dont 82% pour les pays cités); à opposer d'emblée aux estimations faites pour les pays tropicaux.

Par ailleurs le transfert embryonnaire représente aujourd'hui 0,25% de l'activité de l'insémination artificielle (Thibier, 1989b).On estime en effet à 80 000 000 le nombre d'inséminations artificielles réalisées par an au niveau mondial. Ainsi le transfert embryonnaire doit-il être envisagé comme une technique complémentaire de l'insémination artificielle, s'intégrant dans un schéma de maîtrise de la reproduction. A cet égard le schéma n°7 nous permet de situer ce nouvel outil dans le concept actuel de "l'insémination artificielle intégrée " (Thibier, cours IEMVT 1989).

Tableau n° 6 : Nombre d'embryons transférés par an, niveau mondial (Référence : IETS, Montréal 1987).

PAYS	NOMBRE	ANNEE	REFERENCE
Europe occidentale	35 000	1986	Thibier M., 1987
Europe orientale	5 000	1986	Motlik J. et Fulka J. 1987
U.S.A. -Canada	125 000	1986	Kraemer D.C., 1987
Australie	15 000	1986	Shelton J.N., 1987
Amérique latine	5 000	1983	IETS, 1984
Afrique	100	1986	Chicoteau P., 1987

Tableau n ° 7 : Nombre d'embryons transférés par an, niveau européen (Référence : AETE, 1989).

PAYS	NOMBRE	ANNEE	REFERENCE
Tchécoslovaquie	22702 (1)	1988	Peletikova J. 1989
France	21615 (2)	1988	Thibier M. 1989
Pays Bas	12307 (2)	1988	Vanlieshout J. 1989
Allemagne (RFA)	9901 (1)	1988	Feddersen E. 1989
Royaume Uni	7500 *	1986	AETE 1987
Italie	3554 (1)	1988	Lauria A. 1989
Irlande	2548 (1)	1988	Boland M. 1989
Belgique	2178 (1)	1988	Beckers J.F. 1989
Pologne	1694 (1)	1988	Morstin J. 1989
Danemark	1268 (1)	1988	Greve T. et Schmidt M.1989
Suisse	737 (1)	1988	Hunzicker F. 1989
Espagne	378 (1)	1988	de la Fuente J. 1989
Norvège	235	1986	AETE 1987
Suède	190 (1)	1988	Gustafsson M.H. 1989
Grèce	102 (3)	1988	Boskos K.et Tsakalof P.1989
Autre pays	1000		
Total	87909*		AETE 1987,1989

* estimation

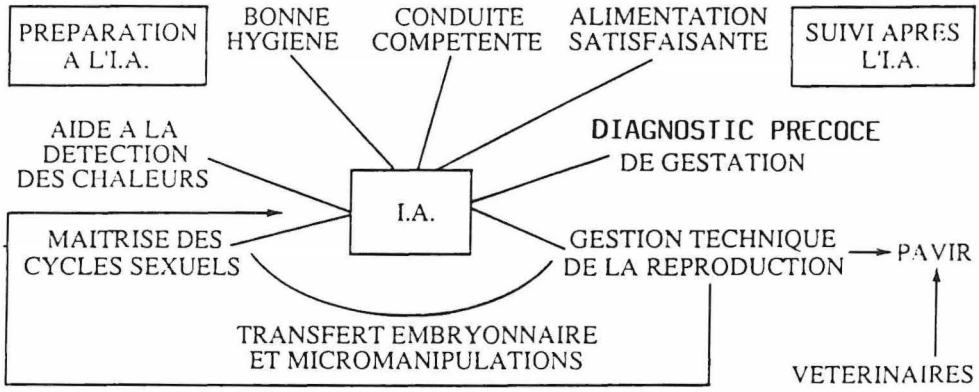
(1) embryons frais et congelés

(2) embryons frais, congelés nationaux et congelés importés

(3) embryons frais et congelés importés

Schéma n°7 :

SCHEMA DU CONCEPT ACTUEL DU RECOURS A L'INSEMINATION ARTIFICIELLE DANS L'ESPECE BOVINE
(THIBIER, 1987)



I. INTERET DU TRANSFERT EMBRYONNAIRE DANS LES PAYS TROCIPAUX

L'intérêt présenté par le développement du transfert embryonnaire dans les pays tropicaux réside dans le fait qu'il représente un outil de diffusion génétique extrêmement rapide. Ainsi pour de nombreux pays intéressés par l'implantation de nouvelles races exotiques, le transfert embryonnaire est-il une technique de choix.

A/ Introduction d'un matériel génétique de choix :

- Garanties assurées: transport, adaptation, sanitaire

Au niveau des échanges internationaux, l'embryon congelé est le mode d'échange le plus intéressant.

La réduction des frais de transports et la supression de l'obligation de quarantaine à l'arrivée sont d'une part très appréciable. D'autre part, le veau ainsi produit est supposé être mieux adapté à l'environnement par l'apport des anticorps maternels pendant la gestation et la lactation. L'adaptation aux nouvelles conditions de milieu qui a freiné de nombreux essais zootechniques, n'apparaît plus de ce fait comme un problème insurmontable.

Enfin l'embryon, en tant qu'individu, offre une garantie sanitaire incomparable ; particulièrement intéressante lorsqu'il s'agit d'échanges d'animaux en provenance de zones incertaines au niveau sanitaire.

L'embryon est alors dans ce cas le seul mode d'exportation possible. A l'inverse, pour un pays qui a su obtenir et maintenir un cheptel sain, l'introduction d'embryons ne présente aucun risque sanitaire (Thibier et Nibart, 1987). L'embryon constitue ainsi le plus sûr moyen d'échange au plan sanitaire (Chupin, 1985; Thibier, 1989a)...

- Sélection pré-établie :

La transplantation embryonnaire étant le plus souvent réservée

aux animaux d'élite, les embryons mis sur le marché international sont de toute évidence d'une très haute valeur génétique. Leur importation permet ainsi la constitution rapide d'un cheptel de haute performance génétique, héritage des années de sélection établies dans le pays exportateur, au sein du troupeau local.

B/ Constitution d'une banque de gènes :

La mise en réserve d'un patrimoine génétique, représentée par la constitution d'une banque d'embryons, intéresse à plus d'un titre certains pays tropicaux.

Ainsi en Afrique la conservation des races trypanotolérantes fait l'objet de plusieurs études qui font déjà appel au transfert embryonnaire. Des premiers essais ont été réalisés au Burkina Fasso sur des bovins de race Baoulé (Bianchi et al, 1986). De plus la FAO, dans son programme d'étude de la reproduction de ce bétail envisage la constitution de banque de gènes qui concernera la semence et les embryons (Thibier, 1988). Par ailleurs, en Afrique de l'Est, l'ILRAD mène des études immuno-génétiques sur la race N'dama (Jordt, 1986 ; 1989 : communication personnelle).

Au demeurant la constitution d'une banque d'embryons permet la sauvegarde des populations menacées ; populations souvent restreintes, bien adaptées à un milieu et à un type d'élevage donné. En matière de conservation des espèces,il serait dangereux de ne considérer que les espèces sauvages. En effet, il existe de nombreuses populations domestiques, elles-mêmes en voie de disparition, qu'il est important de préserver dès maintenant. A ce titre nous signalons que le Brésil a déjà lancé un programme de sauvegarde de ses races bovines en voie d'extinction (De Bem, 1989 : communication personnelle ; cf infra).

La constitution d'une banque de gènes peut se réaliser par le stockage de semence ou d'embryons. Il semble toutefois que si les embryons sont plus coûteux à obtenir, ils préservent cependant mieux l'intégrité du patrimoine génétique (Smith C., cité par Chicoteau P., 1987).

II. REALISATION ACTUELLE DU T.E. DANS LES PAYS TROPICAUX : RESULTATS D'ENQUETE

Compte tenu de l'augmentation rapide, actuelle, du transfert embryonnaire dans les pays développés, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'obtenir quelques données chiffrées récentes sur l'évolution de cette activité dans les pays sous-développés. A cette fin en collaboration avec l'IEMVT (Dr Vre Chabeuf) et le Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs (Dr Vre Thibier), nous avons réalisé un questionnaire dont l'analyse fait l'objet de la suite du présent rapport.

Nous tenons à signaler d'emblée que ce résultat d'enquête ne prétend pas établir un bilan des activités du transfert embryonnaire dans les pays tropicaux mais doit être envisagé comme un exercice original et une tentative de liaison entre les biotechnologies actuellement développées dans les pays riches (technique de fécondation in vitro qui a fait l'objet de notre stage) et leur application actuelle dans les pays tropicaux.

Par ailleurs les données fournies par le compte rendu du 23ème congrès mondial vétérinaire (IETS, Montréal 1987) ne seront pas reprises dans cet exposé. En effet ce document constitue un élément de base intéressant mais sa reprise au sein de ce mémoire déborde le cadre de la démarche personnelle que nous nous sommes fixée.

A. Support de l'enquête :

1/ Questionnaire réalisé :

La présentation du questionnaire , tel qu'il a été envoyé, est rapportée sur le schéma n°8 . Sa rédaction a été réalisée en collaboration avec les Docteurs Vétérinaires Chaboeuf et Chicoteau (IEMVT).

Les premières questions posées visaient à situer l'activité

Pays/Country:
Organisme/Name of the organisation:
Structure privée ou publique/Private or public organisation:

TRANSFERT EMBRYONNAIRE/EMBRYO TRANSFER:

Nombre de donneuses collectées par an:
Numbers of treated and donor cows/ year:.....

Nombre d'embryons récoltés par donneuse collectée:
Number of embryos obtained per collected donor :.....

Nombre total d'embryons transférés:
Total number of transferred embryos:.....

1°/Nombre d'embryons produits et transférés localement:
Number of embryos produced and transfered locally:..

Nombre de veaux nés:
Number of calves born:.....

2°/Nombre d'embryons importés:
Imported embryos: number of transfer:.....

Nombre de veaux nés:
Number of calves born:.....

Objectifs/Porpose:

Recherche/Research:

Amélioration génétique/Breed improvement:

Implantation de race exotique/To develop an exotic breed:

Priorité viande/Beef priority:

Priroté lait/Dairy priority:

INSÉMINATION ARTIFICIELLE/ARTIFICIAL INSEMINATION:

Nombre de doses produites:
Semen production: number of doses per year:.....

Nombre de doses importées:
Number of imported doses per year:.....

Nombre de doses utilisées par an:
Number of doses used per year:.....

Taux de gestations (I.A. première):
Pregnancy rate at first service:.....

Merci par avance/Thanking you in advance

Schéma n°8 : Questionnaire support de l'enquête.

du transfert embryonnaire dans le pays concerné : structure privée ou organisme d'état.

Les questions relatives à l'activité du transfert embryonnaire ont été difficiles à sélectionner. En effet, habitués aux données statistiques européennes (AETE) nous étions tentés de poser de nombreuses questions sur les protocoles utilisés et la réponse à la superovulation obtenue. Mais la nécessité de rédiger un questionnaire bref et facile de compréhension, nous a obligé à limiter notre domaine d'enquête. Les questions posées sont donc d'ordre général et il nous est apparu intéressant de souligner les objectifs poursuivis dans l'utilisation de cette activité.

Par ailleurs un volet insémination artificielle a été inséré au sein de ce questionnaire. Celui-ci s'adressait particulièrement aux pays qui ne pratiquent pas encore le transfert embryonnaire. Afin de cerner leur état d'avancement dans la maîtrise des techniques de reproduction artificielle chez les bovins.

2/ Personnes interrogées :

Bénéficiant de l'encadrement du Docteur Thibier, nous avons principalement adressé notre questionnaire à des anciens stagiaires du Laboratoire pour le Contrôle des Reproducteurs. Par ailleurs quelques adresses nous ont été aimablement communiquées par Mr BOUSSEAU de la Société IMV (61. l'Aigle - France).

La liste des personnes et pays interrogés est représentée sur le schéma n° 9 et s'établit comme suit :

AFRIQUE : (et îles proches)

AFRIQUE DU SUD	:	N. SCHUTTE.....	Irene
COTE D'IVOIRE	:	C. MEYER.....	Bouaké
KENYA	:	J. JORDT.....	Nairobi
MADAGASCAR	:	J. RANARISON.....	Tananarive

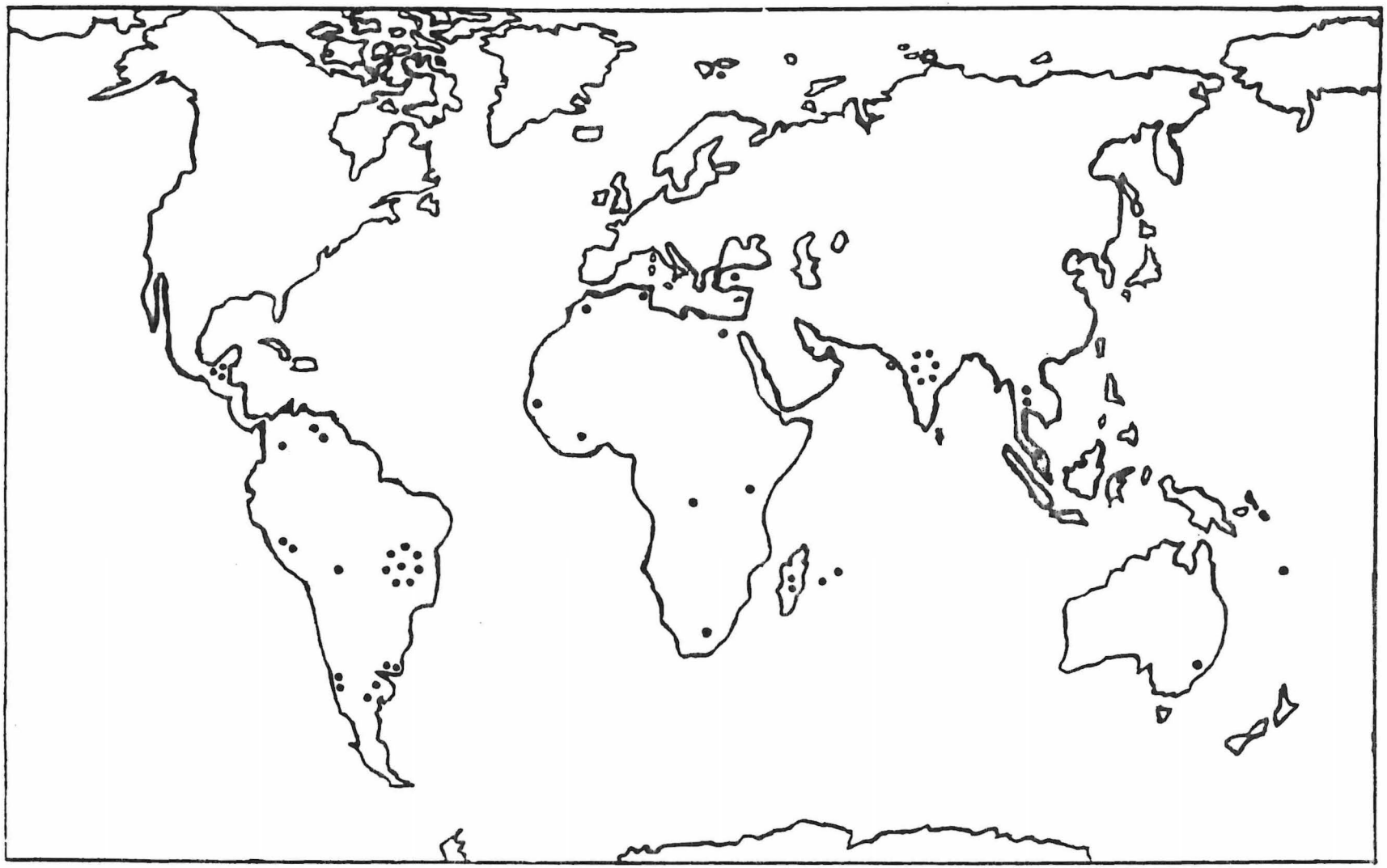


Schéma n° 9 : Répartition géographique des demandes adressées.

MADAGASCAR	: E.	RABEZAKARIVO	Tananarive
MAURICE	: L.	PRAYA.....	Réduit
REUNION	: R.	LAN CHIN.....	Ste Clotilde
SENEGAL	: M.	M'BAYE.....	Kolda
ZAIRE	: R.	RUBONEKA.....	Goma

AMERIQUE DU SUD :

ARGENTINE	: H.	BALDASSARE.....	Buenos Aires
	: C.J.	MUNAR.....	La Plata
BOLIVIE	: A.	CARDOZO.....	La Paz
BRESIL	: M.A.	DALLA PORTA.....	Santa Maria
	R.	DE BEM	Brasilia
	G.	DOUGLAS	Botucatre
	R.	HERRERA	Nova Odessa
	J.P.	MASSAT.....	Sao Paulo
	E.	OLIVEIRA	Jabuticabal
	O.	OLIVEIRA	Sao Paulo
	J.L.	RODRIGUEZ	Porto Allegre
CHILI	: J.E.	CORREA.....	Valdivia
	M.R.	DEL CAMPO.....	Valdivia
COLOMBIE	: C.E.	STIEFKEN	Bogota
MEXIQUE	: A.M.	AGAYO.....	Merida
	J.P.	BUILLY	Mexico
	C.	SILVA MENA	Merida
PEROU	: V.	BUSTINZA CHOQUE..	Puno
		SUMAR	La Raya

URUGUAY	: R.	FERNANDEZ	Montévidéo
	E.	ROMANO	Montévidéo
VENEZUELA	: R.	GONZALEZ.....	Estado Zulia
	J.	PAPARELLA	Barquisimeto

ASIE :

INDE	: K.	KAVIERAPPA	Tiptur
	S.	LOKHANDE	Navel
	A.K.	MISRA	Pin
	S.K.	SINGLA.....	Haryana
		SURI-K-ANIL.....	New Dehli
		YANYANVANE.....	Maharashtra
MALAISIE	:M.R.	JAINUDEEN.....	Kuala Lampur
THAILANDE	: P.	CHANTARAPRATEEF..	Bangkok
	S.	SRIPONGPUN.....	Songkhla

OCEANIE : (et îles du pacifique)

AUSTRALIE	:J.N.	SHELTON	Canberra
NELLE CALEDONIE	: M.	M.BIANCHI.....	Nouméa

A cette liste, nous devons ajouter quelques pays situés sur le bassin méditerranéen, qui ont fait également l'objet de notre enquête :

EGYPTE	: G.	ABDEL MALAK.....	Le Caire
MAROC	: H.	LAKDHISSI.....	Rabat
TUNISIE	: N.	SLIMANE	Sidi Thabet
TURQUIE	: F.	CEDDEN	Ankara

B/ Résultats :

La distribution géographique des réponses reçues est rapportée sur le schéma n°10. Celles-ci seront énoncées successivement et discutées ultérieurement , dans la dernière partie du présent rapport . Nous remercions vivement les personnes qui nous ont envoyé les informations suivantes.

AFRIQUE :

AFRIQUE DU SUD :

Le Docteur Vétérinaire SCHUTTE, ne pratique pas de transfert embryonnaire au sein de l'organisation publique Taurus Coop.

L'insémination artificielle est cependant relativement développée par cet organisme. En effet 1,5 million de doses sont produites chaque année et 200 000 sont importées, tandis que 900 000 doses sont utilisées. Le taux de gestation au premier service est de 50%

COTE D'IVOIRE :

Selon Mr C. MEYER, le transfert embryonnaire n'est pas pratiqué dans ce pays. Les recherches actuelles portent sur les méthodes de synchronisation des chaleurs. Ce pays est doté d'un centre national d'insémination artificielle, localisé à Bingerville.

En 1988, 6440 doses de semence ont été retenues et 436 vaches inséminées après synchronisation. Sur 258 femelles contrôlées à ce jour, 57,36% sont gestantes.

KENYA :

L'ILRAD , organisme public international, étudie depuis plusieurs années le bétail trypanotolérant et travaille en particulier sur les cartographies des gènes de bovins N'Dama, prouvant ainsi que le

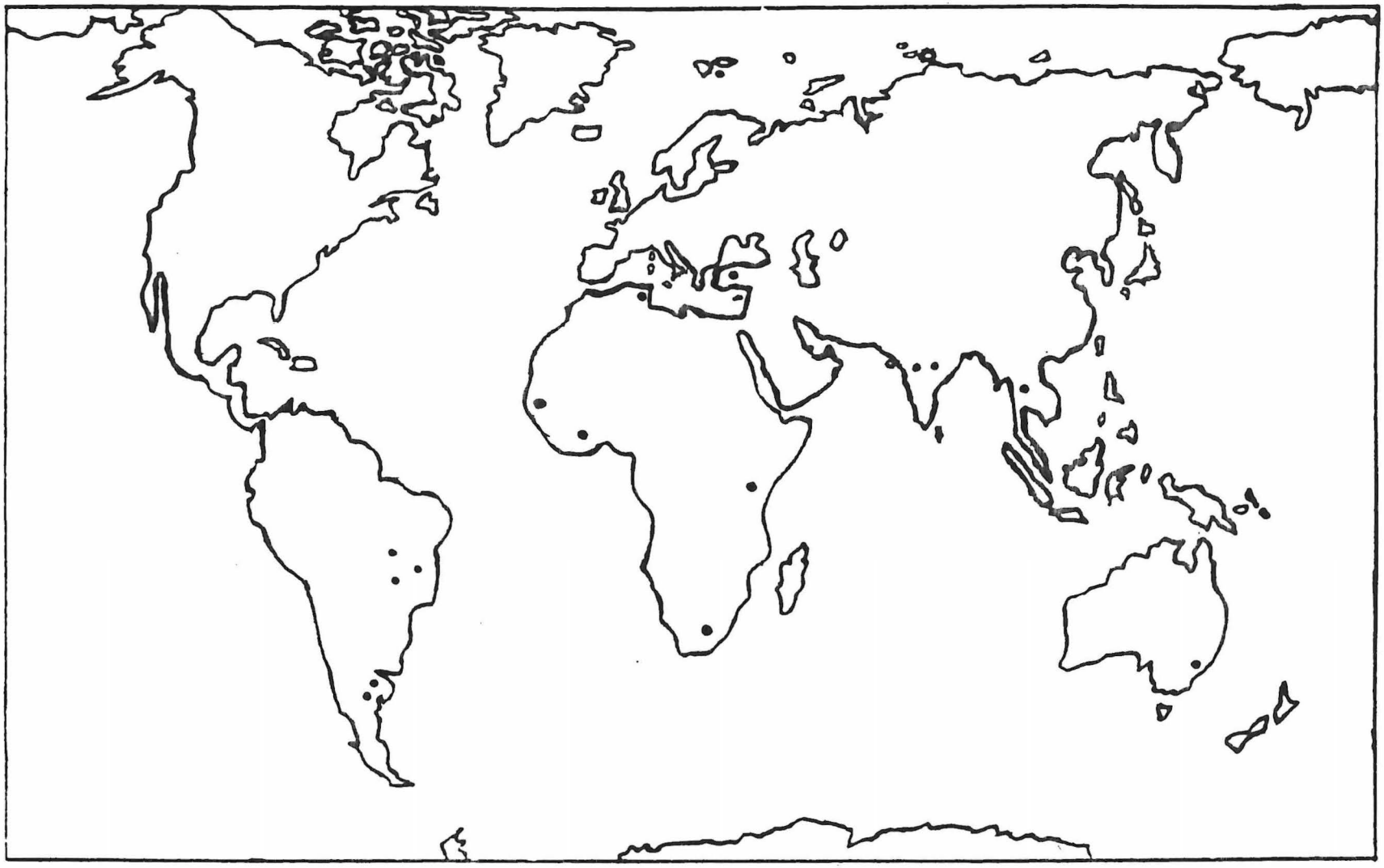


Schéma n° 10 : Répartition géographique des réponses reçues.

transfert embryonnaire peut être un outil de recherche.

Sur les 600 embryons déjà transférés, 225 naissances ont été enregistrées. En moyenne 70 à 80 collectes sont réalisées chaque année. Les taux de gestation enregistrés varient de 15 à 40% pour les embryons de pauvre qualité (C et D) à 60-65% pour ceux de bonne qualité (A et B).

Par ailleurs le Dr Vre T.Jordt nous a signalé qu'à titre privé des équipes américaines et plus récemment danoises, sont venues réaliser des opérations de transfert embryonnaire chez des particuliers possédant du bétail Frison et Blanc Bleu Belge (1981-1988).

AMERIQUE DU SUD :

ARGENTINE :

L'enquête réalisée dans ce pays s'est avérée réellement positive. En effet chacune des 2 personnes interrogées nous a fait l'honneur de nous adresser une réponse aussi complète que possible.

Ainsi selon les données recueillies par le Dr Vre H.Baldassare 1500 vaches seraient collectées chaque année en Argentine. Le transfert embryonnaire y est réalisé par des équipes privées. A titre d'exemple Munar et collaborateurs (équipe privée que nous avons questionnée) collectent 650 vaches par an. Le taux de collecte est de 4,8 embryons transférables par femelle collectée. Le nombre total d'embryons transférés par cette équipe est de 2800/an. Celui-ci se divise en 2500 embryons produits localement et 300 importés, le nombre de veaux nés résultants est de 1500 et 150 respectivement.

L'objectif poursuivi est principalement l'amélioration génétique. Toutefois certains travaux de recherche sont actuellement en cours. Munar et coll. nous ont confié travailler sur la transmission du virus de la fièvre aphteuse par le transfert d'embryons, ainsi que sur les protocoles de superovulation et de cryopréservation. Par ailleurs certaines races exotiques, telle la Blonde d'Aquitaine, ont bénéficié de cette technique pour leur implantation.

Le transfert embryonnaire réalisé en ferme concerne à 60% le cheptel viande.

Par ailleurs H. Baldassare rapporte que 2.000 000 doses de

AFRIQUE

SENEGAL :

Le Dr Vre M. M'Baye , travaillant au sein de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles nous a communiqué les informations suivantes.
Aucune activité de transfert embryonnaire n'est pratiquée au Sénégal, tandis que l'insémination artificielle reste un secteur peu développé.
En effet afin de développer un cheptel laitier exotique, 400 doses de semence sont importées chaque année dont 300 sont utilisées, avec un taux de gestation au premier service de 52% .

semences sont produites chaque année ; à celles-ci s'ajoutent 90 000 doses importées, pour une utilisation finale de 1 400 000 doses/an. Le taux de gestation au premier service est de 50-55%.

BRESIL :

Il semble, selon les estimations du Dr Vre J.L. Rodriguez que 20 à 22 000 transferts sont réalisés chaque année au Brésil. Environ 10% serait réalisé dans le secteur public, le reste appartenant au domaine privé. Le nombre de vaches collectées chaque année serait de 4000 ; avec un taux moyen de 5 embryons transférables par collecte.

Le transfert est réalisé à 80% par voie cervicale et le Brésil importerait 1000 à 1500 embryons par an.

Par ailleurs la transplantation embryonnaire est également pratiquée sur les zébus Nelor. Le taux moyen d'embryons transférables collectés est alors de 7. En moyenne 1000 embryons Nelor sont exportés chaque année vers le Mexique, le Paraguay, l'Afrique du Sud et dans une moindre mesure vers la Colombie et le Vénézuela.

Dans le secteur de la recherche, la Faculté des Sciences Agricoles et Vétérinaires de Jaboticabal, Dr Vre E. Oliveira, étudie la physiologie de la reproduction des vaches donneuses (différents protocoles de superovulation). Pour sa première année d'activité (octobre 1988-juillet 1989) , ce programme n'a porté que sur 7 femelles collectées et 21 embryons transférés donnant lieu à 13 naissances.

Enfin le Dr Vre R. de Bem, pratique le transfert embryonnaire sur des espèces domestiques en voie de disparition. Cette activité est soutenue par l'organisme publique EMBRAPA/CENARGEN (Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia) et fait l'objet d'une centaine de collectes et transferts chaque année.

ASIE :

INDE :

Sur les différents questionnaires envoyés dans ce pays deux réponses nous sont parvenues d'organismes publiques.

Le Dr Vre S.K. Singla travaillant au sein du National Dairy Research Institute, nous a confié avoir réalisé 35 collectes et 65 transferts ayant donné naissance à 26 veaux. Ces résultats ne sont qu'une première estimation puisque, selon le Dr Singla, cette activité est en expansion et sera prochainement entreprise sur des bufflesses. Cet organisme contrôle également la production de semence (100 000 doses/an) et son utilisation (2 500 doses/an). Le taux de gestation enregistré au premier service est de 43%.

Par ailleurs, sous la direction du National Dairy Development Board, le Dr Vre A.K. Misra pratique la transplantation embryonnaire sur vaches et bufflesses. Ainsi récemment 69 vaches et 70 bufflesses ont-elles été collectées. Le nombre d'embryons transférés était respectivement de 143 (dont 119 à l'état congelé) et 102 (dont 59 à l'état congelé). Les gestations en cours sont au nombre de 9 pour les vaches et 12 pour les bufflesses. Une expérimentation antérieure avait déjà permis la naissance de 7 veaux dans chacune des deux espèces étudiées. Le taux de gestation au premier service rapporté par le Dr Misra est de 62%.

THAILANDE :

Selon le Prof. Chataraprateep (Chulalongkorn Université), l'activité de transfert embryonnaire est en voie de développement, ainsi 1000 embryons ont-ils été récemment importés, mais aucun résultat ne peut être à ce jour communiqué.

Par ailleurs, l'insémination artificielle est une activité relativement bien développée, puisqu'elle intéresse les races à viande Brahman, Charolaise, Hereford et Limousin et les races laitières Sahiwal Redsindi , Frisonne et Red Dane. Le nombre de doses importées était de

99 000 pour l'année 1988 tandis que la production locale, toutes les races confondues , dépassait les 270 000 doses.

OCEANIE :

AUSTRALIE :

Depuis 1987 (données IETS, Montréal) l'activité du transfert embryonnaire s'est particulièrement développée dans l'espèce bovine. En effet, selon le Dr Vre J.N. Shelton le nombre de transferts a doublé en deux ans. Ainsi peut-on estimer globalement que 30 à 40 000 transferts d'embryons bovins sont réalisés chaque année en Australie.

BASSIN MEDITERRANEEN :

TUNISIE :

La réponse à notre questionnaire, formulée par le Dr Vre N. Slimane, rend compte de l'activité exercée au sein de l'Ecole Vétérinaire de Sidi-Thabet. Ainsi en 1988, 43 vaches ont été collectés (sur 61 traitées) avec un taux moyen d'embryons de 5,6. Le nombre de transferts réalisés est de 54, ayant permis la naissance de 16 veaux. Cette activité semblait prometteuse pour l'année 1989 mais pour des raisons administratives, celles-ci fut stoppée à la fin du mois de mai.

De plus, pour ce qui est de l'insémination artificielle, la Tunisie a produit environ 80 000 doses de semence en 1988, en a importé 120 000 et utilisé 92 000 à cette même date. Le taux de réussite à la première I.A. est par ailleurs de 50%.

TURQUIE :

Le Dr Vre F.Cedden, de l'Institut de Recherche Zootechnique de Lalahan, nous a confié qu'à l'heure actuelle la transplantation embryonnaire n'est réalisée qu'au sein d'organismes de recherche en vue d'étudier la réponse ovarienne au traitement de superovulation, appliqué

dans les conditions locales (moins de 10 collectes par an).

Toutefois l'insémination artificielle est déjà un secteur développé. En effet 1 400 000 doses sont produites chaque année et 90 000 doses sont importées, dans le secteur public. A ces chiffres s'ajoutent 10 à 12 000 doses importées à titre privé. Globalement en 1988, 642 000 doses de semence ont été mises en place. Le taux de gestation résultant de la première et seconde I.A. confondues est de 72%.

C/ Discussion - Conclusion:

Cette étude montre une fois de plus, s'il en était besoin, la difficulté de réaliser une enquête dans le monde tropical. Ceci est particulièrement vrai lorsqu'elle est mise en place à distance (par courrier) sur une courte période (trois mois).

Le nombre de réponses obtenues, limité à 15, ne constitue pas un échantillon significatif pour permettre de dresser un bilan réaliste de la situation. Néanmoins le but de cette étude était avant tout d'avoir un aperçu de l'impact actuel et du potentiel de développement du transfert embryonnaire dans les pays tropicaux.

Conscients de ces handicaps, nous pouvons toutefois dégager certaines remarques intéressantes :

- Une réelle motivation des personnes interrogées :

Le nombre de réponses obtenues (15 réponses/47 demandes = 32%) démontre l'importance accordée à cette nouvelle technique. Rappelons que l'enquête a été réalisée sur la base d'un seul questionnaire envoyé par courrier (aucune relance). Ceci témoigne donc d'un réel besoin d'échange, de communication d'information des personnes travaillant dans ce domaine. Qui plus est, le fait que plusieurs chercheurs nous aient demandé, par retour, le résultat de notre enquête, confirme cet intérêt actuel et le manque de données existantes à ce jour.

- Une réalité scientifique :

Le transfert embryonnaire est pratiqué à différents niveaux dans les pays tropicaux en fonction du stade d'avancement des recherches entreprises.

Ainsi en Amérique Latine où le transfert embryonnaire débuta au Guatemala en 1976 (Del Campo, 1987), cette activité fait déjà l'objet à l'heure actuelle d'une exploitation commerciale (Brésil, Argentine - secteur privé). Au demeurant certains pays ont déjà mis en place une législation relative aux échanges des embryons au niveau international (Brésil, Argentine, Chili, Equateur : Del campo, 1988 ; Uruguay : Decuadro, 1989 communication personnelle).

Par contre dans certains pays d'Afrique ou d'Asie, cette activité n'est encore principalement qu'un outil de recherche. Nous rappelerons les travaux entrepris par Jordt (Kenya) depuis plusieurs années sur le bétail trypanotolérant ainsi que le programme FAO qui pourrait être prochainement mise en place en Afrique de l'Ouest (cf supra, bovins trypanotolérants, Thibier 1988).

- Une carence de l'information

Les différentes lettres reçues témoignent d'un réel défaut de communication de l'information au sein des pays enquêtés. En effet comme le rapporte Del Campo (1987) les statistiques officielles relatives à l'usage des biotechnologies , n'existent pas, ou bien sont impossibles à obtenir dans les pays sous-développés. Il y a là une évidente discordance entre la motivation des scientifiques (et hommes de terain) et la volonté des responsables de l'élevage, à promouvoir la transplantation embryonnaire.

En conclusion, il est donc intéressant de noter que cette activité présente d'ores et déjà un potentiel de développement (scientifiques compétents, recherches entreprises) qui, nous l'espérons, sera exploité dans les années à venir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **AOYAGI Y., FUKUI Y., IWAZUMI Y., URAKAWA M., MINEGISHI Y. & ONO H.** - 1989 - Effects of cultive system on development of in vitro-fertilized bovine ova into blastocysts. - **Theriogenology**, 31 : 168.

- **AOYAGI Y., FUJII K., IWAZUMI Y., FURUDATE M., FUKUI Y. & ONO H.** - 1988 - Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. - **Theriogenology**, 30 : 973-985.

- **AUSTIN C.R.** - 1951 - Observations of the penetration of sperm into mammalian egg. - **Austr. J. Sci. Res.**, B4 : 581-589.

- **BERG U. & BREM G.** - 1989 - In vitro production of bovine blastocyts by in vitro maturation and fertilization of oocytes and subsequent in vitro culture. - **Zuchthyg.**, 24 : 134-139.

- **BIANCHI M., CHICOTEAU P., CLOE C. & BASSINGA A.** - 1986 - Premiers essais de transferts d'embryons sur bovins de race Baoulé au Burkina Fasso. - **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.**, 39 : 139-144.

- **BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J. & EVANS J.F.** - 1981 - Pregnancy following cow in vitro fertilization. - **Biol. Reprod.**, 24 (suppl. 1) : 173 (109 A).

- **BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F. & DRESSEL M.A.** - 1982 - Normal development following in vitro fertilization in the cow. - **Biol. Reprod.**, 27 : 147-158.

- **BRACKETT B.G. & OLIPHANT G.** - 1975 - Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. - **Biol. Reprod.**, 12 : 260-274.

- **CAIRD E.R.** - 1989 - Co-culture of domestic animal embryos. - **Theriogenology**, 31 : 105-114.

- **CHANG M.C.** - 1951 - Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. - **Nature**, 168 : 697.

- **CHICOTEAU P.** - 1987 - Perspectives et réalités du transfert d'embryons en Afrique. - In : **"International Embryon Movement symposium of the XXIII Word Veterinary Congress"**, Montréal (Canada), Aout 1987, pp. 40-53.

- **CHUPIN D.** - 1985 - Applications pratiques du transfert d'embryons chez les bovins. - **El. & Ins.**, 206 : 3-16.

- **CRITSER E.S., LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L. & FIRST N.L.** - 1986 - Influence of cumulus cell association during in vitro maturation of bovine oocytes on embryonic development. - **Biol. reprod.**, 34 (Suppl.1) : 286 (192a).

- **DEL CAMPO M.R. & DEL CAMPO C.H.** - 1987 - Current status, advantages and potential applications of embryo transfer in relation to animal production and/or species preservation in central and south America ; the West Indies. In : **"International Embryon Movement symposium of the XXIII Word Veterinary Congress"**, Montréal (Canada), Aout 1987, pp. 55-62.

- **DEL CAMPO M.R. & DEL CAMPO C.H.** - 1988 - Transferencia de embriones en Centro y Sudamerica : donde estamos y hacia donde iremos. - In : **" XVI Jornadas Uruguayas de Buiatria - Paysandú, R.O.U."**, 15-17 juin 1988.

- **ECTORS F.J., VAN DER ZWALMEN P., TOUATI K., BECKERS J.F. & ECTORS F.** - 1988 - Obtention de blastocystes après maturation et fécondation in vitro d'ovocytes de bovin : premiers résultats. - **Ann. Med. Vet.**, 132 : 517-519.

- **EHRENWALD E., PARKS J.E. & FOOTE R.H.** - 1988 - Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. - **Gamete Res.**, 20 : 145-157.

- **EYESTONE W.H., LEIBFRIED-RUTLEDGE, NORTHEY D.L., GILLIGAN B.G. & FIRST N.L.** - 1987 a - Culture of one and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. - **Theriogenology**, 28 : 1-7.

- **EYESTONE W.H., VIGNIERI J. & FIRST N.L.** - 1987 b - Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. - **Theriogenology**, 27 : 228.

- **FAYRER-HOSKEN R.A., YOUNIS A.I., BRACKETT B.G., McBRIDE C.E., HARPER K.M., KEEFER C.L. & CABANISS D.C.** - 1989 - Laparascopic oviductal transfer of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. - **Theriogenology**, 82 : 413-420.

- **FIRST N.L. & PARRISH J.J.** - 1987 - In vitro fertilization of ruminants. - **J. Reprod. Fert.**, Suppl. 34 : 151-165.

- **FIRST N.L. & PARRISH J.J.** - 1988 - Sperm maturation and in vitro fertilization. - In : **"11th Internat. Congr. Anim. Reprod. and A.I."**, Vol. 5, pp. 160-168.

- **FUKUI Y.** - 1989 - Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. - **J. Anim. Sci.**, 67 : 1318-1323.

- **FUKUI Y., FUKUSHIMA Y., TERAWAKI Y. & ONO H.** - 1982 - Effect of gonadoptropins, steroïds and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. - **Theriogenology**, 18 : 161-175.

- **FUKUI Y. & ONO H.** - 1988 - In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilised bovine oocytes. - **Vet. Rec.**, 122 : 282.

- **FUKUI Y., URAKAWA M., SASAKI C., CHIKAMATSU N. & ONO H.** - 1989 - Development to the late morula or blastocyst stage following in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. - **Anim. Reprod. Sci.**, 18 : 139-148.

- **GANDOLFI F. & MOOR R.M.** - 1987 - Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. - **J. Reprod. Fert.**, 81 : 23-28.

- **GOTO K., KAJIHARA Y., KODA M. & NAKANISHI Y.** - 1988 - Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in vitro and their transfer to the cow uterus. - **Theriogenology**, 29 : 251.

- **GREVE T., XU K.P., CALLESEN H. & HYTTEL P.** - 1989 - Calves resulting from in vitro fertilization of oocytes. - **Zuchthyg.**, 24 : 79-83.

- **HEYMAN Y. & MENEZO Y.** - 1987 - Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos developing in vitro. - In : **"The mammalian preimplantation embryo"**, Bavister B.D. Ed., Plenum C, 175-191.

- **HYTTEL P., XU K.P. & GREVE T.** - 1988 - Scanning electron microscopy of in vitro fertilization in cattle. - **Anat. Embryol.**, 178 : 41-46.

- **IWASAKI S., KONO T., NAKAHARA T., SHIOYA Y., FUKUSHIMA M. & HANADA A.** - 1987 - New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to in vitro maturation and fertilization. - **Jpn. J. Anim. Reprod.**, 33 : 188-191.

- **JORDT T., MAHON G.D., TOURAY B.N., NGULO W.K., MORRISON W.I., RAWLE J. & MURRAY M.** - 1986 - Successful transfer of frozen N'Dama embryos from the Gambia to Kenya. - **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, 18 : 65-75.

- **KAJIHARA Y., GOTO K., KOSAKA S., NAKANISHI Y. & OGAWA K.** - 1987 - In vitro fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts in vitro. - **Jpn. J. Anim. Reprod.**, 33 : 173-180.

- **KOEHLER J.K.** - 1981 - Lectins as probes of the spermatozoon surface. - **Arch. Androl.**, 6 : 197-217.

- **LAMBERT R.D., BERNARD C., RIOUX J.E., BELAND R., D'AMOURS D. & MONTREUIL A.** - 1983 - Endoscopy in cattle by the paralumbar route : technique for ovarian examination and follicular aspiration. - **Theriogenology**, 20 : 149-161.

- **LAMBERT R.D., SIRARD M.A., BERNARD C., BELAND R., RIOUX J.E., LECLERC P., MENARD D.P. & BEDOYA M.** - 1986 - In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. - **Theriogenology**, 25 : 117-133.

- **LE GUIENNE B.** - 1986 - La fécondation chez les bovins. Revue bibliographique. - **El. & Ins.**, 211 : 3-14.

- **LE GUIENNE B., THIBAULT C., CHUPIN D., GERARD M. & THIBIER M.** - 1988 - Fécondation In vitro chez les mammifères domestiques : état actuel et perspectives. - **El. & Ins.**, 225 : 13-22.

- **LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L., CRITSER E.S., PARRISH J.J. & FIRST N.L.** - 1989 - In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. - **Theriogenology**, 31 : 61-74.

- **LU K.H., McDONNELL H.F. & GORDON I.** - 1989 - Birth of calves after in vitro maturation and fertilization of follicular oocytes. - **Theriogenology**, 31 : 222.

- **MARQUANT-LE GUIENNE B., GERARD M., CHUPIN D. & THIBAULT C.** - 1988 - Developpement in vitro de l'oeuf bovin après fécondation in vitro. - In : **"4ème Colloque Scientifique de l'A.E.T.E., Lyon, 9-10 Septembre 1988"**. pp. 33.

- **MARQUANT-LE GUIENNE B., HUMBLOT P., THIBIER M. & THIBAULT C.** 1990 - Evaluation of bull sperm fertility by homologous in vitro fertilization test. - **Reprod. Nutr. Develop.** (In press).

- **MASSIP A., ZWIJSEN W. & MULNARD J.** - 1983 - Cinematographic analysis of the cleavage of the cow egg from 2-cell to 16 cell stage. - **Arch. Biol.** (Bruxelles), 94 : 99-106.

- **PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J., WINER M.A. & FIRST N.L.** - 1988 - Capacitation of bovine sperm by heparine. - **Biol. Reprod.**, 38 : 1171-1180.

- **RENARD J.P.** - 1989 - L'expression des gènes au début du developpement embryonnaire. - In : **"Rapport de la 28ème réunion de la Société Française pour l'Etude de la fertilité. Génétique et reproduction"**, Paris, 19-21 Octobre 1989.

- **SCHELLANDER K., FAYRER-HOSKEN R.A., KEEFER C.L., BROWN L.M., MALTER H., McBRIDE C.E. & BRACKETT B.G.** - 1989 - In vitro fertilization of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy. - **Theriogenology**, 31 : 927-934.

- **SINGH G., TOTEY S.M. & TALWAR G.P.** - 1989 - in vitro fertilization of Buffalo (Bubalus bubalis) oocytes matured in vitro. - **Theriogenology**, 31 : 255.

- **SIRARD M.A. & LAMBERT R.D.** - 1985 - In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. - **Biol. reprod.**, 33 : 487-494.

- **SIRARD M.A. & LAMBERT R.D.** - 1986 - Birth of calves after in vitro fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. - **Vet. Rec.**, 119 : 167-169.

- **SIRARD M.A., LAMBERT R.D. & GUAY P.** - 1986 - In vitro development of in vitro fertilized bovine follicular oocytes obtained by lapascopy. - **Anim. Reprod. Sci.**, 12 : 21-29.

- **SIRARD M.A., LAMBERT R.D., MENARD D.P. & BEDOYA M.** - 1985 - Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. - **J. Reprod. Fert.**, 75 : 551-556.

- **STUBBINGS R.B., ARMSTRONG D.T., BERIAULT R.A. & BASRUR P.K.** - 1988 - A method for aspirating bovine oocytes from small vesicular follicles : preliminary results. - **Theriogenology**, 29 : 312.

- **THIBAULT C.** - 1967 - Analyse comparée de la fécondation et de ses anomalies chez la brebis, la vache et la lapine. - **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, 7 : 5-23.

- **THIBAULT C. & CROZET N.** - 1988 - La fécondation in vitro des ovocytes de brebis et de vache peut-elle entrer dans la pratique de l'élevage ? - In : **"Proc. 3rd World Cong. Sheep & Beef Cattle Breeding"**, 19-23 juin 1988, Paris. pp. 79-91.

- **THIBAULT C. & GERARD M.** - 1987 - La fécondation in vitro est-elle semblable à la fécondation in vivo ? - In : **"Activités gynécologiques"**, 26, Netter A. Ed., Masson, Paris.

- **THIBIER M. & NIBART M.** - 1987 - Disease control and embryo importations. - **Theriogenology**, 27 : 37-48.

- **THIBIER M.** - 1988 - Modalités de mise en place d'études sur la reproduction du bétail trypanotolérant. - In : **"Rapport du 1er atelier de travail sur la reproduction du bétail trypanotolérant en Afrique de l'Ouest et Centrale"**, Addis-Abeba (Ethiopie), 7-11 mars 1988, F.A.O.

- **THIBIER M.** - 1989 a - Aspects sanitaires et réglementaires. In : **"Quel marché, quel avenir pour les embryons - Journée de l'Association pour l'Etude de la Reproduction Animale"**, Paris, 26 janvier 1989.

- **THIBIER M.** - 1989 b - Transferencia de embriones en bovinos In : **"XXI Jornadas de Estudio sobre produccion animal"**, Zaragoza (Espagne), 9-11 mai 1989. Ed. A.I.D.A. pp. 137-209.

- **UTSUMI K., KATOH H. & IRITANI** - 1988 - Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. - **Theriogenology**, 29 : 320.

- **WASSARMAN P.M.** - 1987 - The biology chemistry of fertilization. - **Science**, 235 : 553-560.

- **WASSARMAN P.M.** - 1989 - La fécondation des oeufs de mammifères. - **Pour la science**, 136 : 52-59.

- **WHEELER M.B. & SEIDEL G.E.** - 1986 - Time course of in vitro capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. - **Theriogenology**, 25 : 216.

- **WHEELER M.B. & SEIDEL G.E.** - 1988 - Capacitation of bull sperm by lysophospholipides and trypsin. - **Theriogenology**, 29 : 325.

- **XU K.P., GREVE T., SMITH S. & HYTTEL P.** - 1986 - Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. - **Acta Vet. Scand.**, 27 : 505-519.

- **XU K.P., GREVE T., CALLESEN H. & HYTTEL P.** - 1987 - Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. **J. Reprod. fert.**, 81 : 501-504.