2003. Journées Recherche Porcine, **35**, 323-338.

Biotechnologies de la reproduction porcine

Pascal MERMILLOD (1), Philippe GUILLOUET (2), Françoise BERTHELOT (1), Françoise MARTINAT-BOTTÉ (1), Martine PLAT (1) et Michel TERQUI (1)

(1) INRA, UMR6073, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly.
(2) INRA, Unité Expérimentale d'Insémination Caprine et Porcine, 86480 Rouillé.

Biotechnologies de la reproduction porcine

Les techniques d'assistance à la reproduction et les biotechnologies qui en sont dérivées sont en plein développement dans l'espèce porcine. L'objectif de cet article de synthèse est de décrire les technologies qui sont d'usage courant en reproduction porcine (méthodes d'insémination, congélation de semence), celles dont l'avancement permet d'envisager des applications dans un avenir proche (production et cryopréservation d'embryons, transfert embryonnaire non chirurgical) et celles qui sont en cours de développement et permettront d'ouvrir dans le futur de nouvelles perspectives pour l'élevage porcin (production d'embryons in vitro, clonage et transgenèse). L'ensemble de ces techniques, y compris celles qui sont d'ores et déjà d'utilisation courante, connaissent des progrès rapides en terme d'amélioration des résultats : nous essaierons de décrire les pistes poursuivies dans ce sens.

Biotechnology in pig reproduction

Assisted reproduction techniques and the biotechnology techniques which are derived from them, are being developed for the pig. The scope of this review paper is to describe reproduction-linked biotechnologies which are currently being used in pig breeding (semen cryopreservation, oestrous induction, methods of artificial insemination) and those which will be used in the near future (embryo production and their cryopreservation, non surgical embryo transfer). The paper also describes more recent techniques which still require improvement before they can be applied in the pig industry (in vitro production of embryos, cloning and transgenesis). All these techniques, including those which are already widely used in pig husbandry, are experiencing rapid improvements in terms of success rates. This paper will describe the research axes explored to obtain these improvements.

INTRODUCTION

Les biotechnologies de la reproduction répondent à un certain nombre de demandes des filières d'élevage, dans un souci de productivité et de cohérence des systèmes. Par exemple, ces biotechnologies peuvent viser à mettre en phase la saison de reproduction, les besoins de production et les ressources alimentaires dans un système donné (cas des productions laitières). Elles visent également l'amplification de la descendance des géniteurs d'élite et donc une meilleure diffusion des acquis génétiques induits par la sélection artificielle (toutes espèces, tous systèmes), ainsi que la conservation de la biodiversité des races domestiques et des espèces sauvages. Au-delà de ces apports aux filières d'élevage, les biotechnologies de la reproduction ouvrent également de nouvelles possibilités d'utilisation des animaux de rente. Elles peuvent permettre par exemple d'utiliser l'animal comme un bioréacteur en vue de produire des protéines à usage pharmaceutique ; elles peuvent permettre de générer des lignées animales modèles pour l'étude de pathologies humaines ou donneuses de tissus ou d'organes susceptibles d'être greffés chez l'homme (xénogreffes). Enfin, les biotechnologies donnent aux chercheurs une occasion unique d'approcher certains mécanismes fondamentaux qui sont à la base de la reproduction sexuée.

Parmi les espèces domestiques, l'espèce bovine a toujours été la tête de file de ces développements technologiques, sans doute du fait de l'intérêt économique qu'elle représente, comparé aux difficultés de reproduction qu'elle connaît (espèce mono ovulante, gestation longue, production laitière élevée). Néanmoins, les autres espèces de rente, ruminants et monogastriques, ont rapidement extrapolé les innovations obtenues dans l'espèce bovine, en les restreignant toutefois aux applications répondant le plus directement à leurs propres attentes et de manière limitée selon les difficultés rencontrées lors de la transposition des techniques, suite aux particularités anatomiques ou physiologiques des espèces concernées.

Chez le porc, la prolificité naturelle de l'espèce a probablement freiné le développement des techniques d'assistance à la reproduction. Cependant, le besoin d'échanges génétiques a constitué un moteur fort pour le développement et l'utilisation de l'insémination artificielle puis de la congélation de semence. D'autres techniques se sont heurtées, lors de leur développement, à des problèmes particuliers à l'espèce. La congélation d'embryons, très utile au stockage et à la préservation de la diversité génétique, a été longtemps rendue impossible du fait des particularités physiologiques des embryons porcins. De la même manière, la production d'embryons in vitro reste anecdotique chez le porc car la transposition des techniques développées dans d'autres espèces s'est avérée infructueuse à cause des particularités physiologiques des gamètes et de l'embryon. Plus récemment, la prise en compte de l'intérêt biomédical des modèles animaux, et plus particulièrement du modèle porcin, a entraîné un effort considérable de recherches vers la maîtrise de technologies comme la transgenèse par micro injection ou le clonage chez le porc. Les succès prometteurs de ces derniers développements ouvrent de nouvelles perspectives de diversification pour l'élevage porcin.

1. TECHNOLOGIES DE LA SEMENCE ET INSÉMINATION

Le chantier de reproduction est un point clef de l'organisation et de la rentabilité en élevage porcin. La conduite de la reproduction se caractérise par une très large utilisation de l'insémination et d'outils de maîtrise du cycle de la femelle. Ces techniques sont utilisées pour la diffusion du progrès génétique mais surtout comme outil de gestion de la conduite en bandes. En France, l'insémination artificielle (IA) s'appuie sur l'organisation de la production : en 2001, 5,545 millions de doses de semence diluée à partir de 4550 verrats ont été produites par 16 centres d'insémination disposant de 32 centres de collecte. On peut estimer qu'environ 70 % des portées sont issues d'inséminations pratiquées avec de la semence issue de centres de production. Il convient d'y ajouter les inséminations pratiquées avec de la semence prélevée à l'élevage, difficilement estimables. Le taux de mise bas obtenu après insémination sur un cycle est de l'ordre de 90 % (INRA – UEICP 86480 Rouillé, données de 2001, non publiées).

Des outils de maîtrise de la reproduction de la femelle sont disponibles pour la synchronisation des œstrus et de la mise bas. En France, en 1995, une cochette sur deux était introduite dans les bandes après un traitement progestatif au Régumate (MARTINAT-BOTTÉ et al., 1996) . De même, environ 60 % des truies inséminées en 1995 ont subi une échographie pour vérifier leur état de gravidité (MARTINAT-BOTTE et al., 1998).

De nouveaux outils en cours de validation sont susceptibles de faire évoluer à court ou moyen terme l'organisation du chantier de reproduction et la diffusion et la gestion de la génétique porcine. A court terme, l'évolution de l'insémination vise à réduire les coûts et le temps passé pour le chantier de reproduction sans diminuer globalement les résultats techniques. La diminution du nombre de spermatozoïdes par dose d'insémination et une diminution du temps passé à détecter les chaleurs et à inséminer sont des points sur lesquels les efforts d'innovation sont portés. A moyen terme, l'utilisation des techniques de cryoconservation de la semence et des embryons peuvent servir comme outils de gestion de la génétique et de la biosécurité.

1.1. Conservation et mise en place de l'insémination

1.1.1. La semence congelée

La cryoconservation de la semence est une technique ancienne dont l'utilisation est réservée à la gestion de la variabilité génétique dans le cadre de cryobanques ou de schémas de sélection pour gérer des lignées et apporter de la souplesse dans le transport de la semence. La mise en œuvre de cette technique est plus coûteuse en temps et en matériel que la semence fraîche et valorise moins bien les collectes. Cependant, des améliorations ont permis d'obtenir des résultats de mise bas assez proches de ceux obtenus après insémination avec de la semence fraîche diluée (BUSSIÈRE et al., 2000 ; THILMANT, 1997). La technique de conditionnement

en paillettes de 0,25 ml permet de simplifier la décongélation (bain-marie à 38°C) et d'obtenir des taux de mise bas et des tailles de portée équivalents avec deux fois moins de spermatozoïdes (tableau 1) (THILMANT, 2001). L'utilisation de l'insémination intra-utérine devrait permettre d'optimiser l'utilisation de la semence congelée.

Tableau 1 - Utilisation de la semence congelée : effets du volume de la paillette et de la dose de spermatozoïdes sur la mise bas et la prolificité après double insémination de truies après le sevrage avec des doses diluées dans 95 ml de BTS (THILMANT, 2001).

Type de paillette	Spz par doses (milliards)	Taux de mise bas % (n)	Taille de portée
0,5 ml	3,8	100 (22)	11,4 ± 0,7
0,25 ml	3,8	90,9 (22)	11,8 ± 0,7
0,25 ml	1,9	86,4 (22)	11,1 ± 0,8

1.1.2. Les techniques d'insémination

L'évolution des techniques de mise en place de la semence a deux objectifs : d'une part réduire le temps de travail, d'autre part diminuer le nombre de spermatozoïdes par dose afin de réduire le coût et d'assurer une plus large diffusion des reproducteurs.

L'insémination cervicale est la technique de routine qui se pratique avec des doses de semence diluée dans un volume de 80 à 100ml contenant 2,5 à 3 milliards de spermatozoïdes. La semence est introduite à l'aide d'une sonde engrenée dans les tubérosités du col. Depuis 1999, Gènes Diffusion propose avec le Gédis un dispositif qui intègre la dose de semence et l'applicateur dont l'intérêt majeur est de simplifier le travail avec toutefois de bons résultats (tableau 2).

Tableau 2 - Résultats de mise bas et de prolificité après insémination avec le Gédis (POUTRAIN, 2002)

Nombre de truies inséminées	12 179
Nombre de truies gestantes à l'échographie	10 583
Nombre de mises bas connues	9 427
Nés totaux	13,5

Il existe plusieurs méthodes d'insémination intra-utérine qui se distinguent par la profondeur à laquelle la semence est déposée au delà du col, la quantité de spermatozoïdes déposés et le volume de la dose. Ces méthodes sont utilisées pour différents modes de conservation de la semence diluée en frais ou décongelée. Elles utilisent des sondes d'insémination classiques qui servent à guider un cathéter qui est poussé au-delà du col et par lequel on introduit la semence.

L'insémination post-cervicale consiste à déposer la semence environ 20 cm au delà du col dans le corps de l'utérus. Cette technique a été expérimentée en élevage par WATSON et BEHAN (2002) en comparaison avec l'insémination cervicale. Les résultats obtenus montrent que cette technique permet d'obtenir des taux de mise bas et des tailles de portée équivalents avec un nombre réduit de spermatozoïdes par dose : 1 milliard vs. 2 ou 3 milliards (tableau 3). Cette technique est en cours de développement dans les élevages sur des truies ayant déjà mis bas.

L'insémination intra-utérine profonde consiste à déposer la semence le plus loin possible du col dans les cornes utérines et le plus près possible de la jonction utéro-tubaire. Le dépôt de la semence peut se faire par chirurgie ou à l'aide de dispositifs associant une sonde d'insémination et des cathéters de longueur et de rigidité différentes, leur permettant de remonter les cornes utérines. Cette méthode d'insémination est destinée à obtenir des fécondations lorsque la quantité de semence fécondante est très limitée (cas de la semence congelée de types génétiques rares ou de la semence triée pour le sexage). KRUEGER et al., (1999) ont inséminé des truies avec des doses de faible volume (5 ml de milieu Androhep) et contenant de faibles quantités de spermatozoïdes ($5x10^8$, $1x10^8$, $1x10^7$, $5x10^6$, $1x10^6$). La semence est déposée par voie chirurgicale à environ 5 cm de la jonction utéro-tubaire. Les résultats de fécondation obtenus après abattage et récupération des embryons 48 heures après l'insémination ne sont pas différents entre les traitements sauf pour la plus faible dose de spermatozoïdes utilisée ($1x10^6$). MARTINEZ et al., (2001) ont pratiqué des inséminations profondes par voie cervicale en utilisant un cathéter mesurant 1,35 m dérivé de ceux utilisés en endoscopie, introduit au niveau du col à l'aide d'une sonde d'insémination. La semence est déposée dans le dernier tiers d'une corne utérine. Des truies multipares (n= 15, 18 et 13) synchronisées ont

Tableau 3 - Résultats après insémination de truies (parité 2 à 11) avec de la semence utilisée de 24 à 48 heures après la collecte. Le milieu de conservation (X-Cell®) et le matériel sont fabriqués par IMV France (d'après WATSON et BEHAN, 2002)

Matériel utilisé	Quantité de spermatozoïdes (milliards)	Taux de gestation %	Taux de mise bas %	Nés totaux	Nés vivants
Goldenpig®	1	66,2	65,8	10,3	9,0
	2	91,1	91,8	12,6	10,9
	3	91,3	91,1	12,5	10,9
Deepgoldenpig ™	1	88,7	86,9	12,1	10,9
	2	92,6	92,5	12,3	10,8
	3	91,8	90,5	12,3	11,0
Total femelles	3240	3230	3201	2768*	2768*

** nombre demises bas connues*

Tableau 4 - Résultats à un mois de gestation après insémination intra-utérine, dépôt de la semence dans la partie distale des cornes : effet du nombre de spermatozoïdes et du volume d'insémination (WOLKEN et al, 2002)

Volume (ml)	Nombre (10^6) de spermatozoïdes	Nombre de truies	Taux de gestation %	Embryons vivants (28-35j)
20	500	22	77,3	12,6
20	100	23	65,2	12,5
10	100	26	61,5	11,3

été inséminées avec des doses de semence de 5 ml contenant respectivement 100, 20 et $5x10^7$ spermatozoïdes. Les truies gestantes (13, 16 et 12) ont mis bas de portées comparables à celles obtenues dans le lot témoin, inséminé classiquement avec $3x10^9$ spermatozoïdes. Plus récemment, WOLKEN et al. (2002) ont inséminé des truies multipares cycliques en déposant la semence à l'aide d'un cathéter de 1 mètre introduit à l'aide d'une sonde, dans le premier tiers de la corne utérine. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 4.

L'insémination intra-tubaire consiste, après extériorisation chirurgicale de la partie haute des cornes utérines, à introduire une aiguille dans chaque corne et déposer dans la lumière de la jonction utéro-tubaire un très faible volume de semence (20 à 500 µl) contenant 6 à 10 millions de spermatozoïdes. Cette méthode (COUROT et al., 1995) est réservée aux situations dans lesquelles on ne dispose que de très peu de semence ou d'une semence à mobilité réduite. Les taux de mise bas sont voisins de 50 % avec des tailles de portée hétérogènes.

Il existe donc un éventail de techniques de mise en place de la semence adapté à différentes situations. La maîtrise progressive de l'insémination intra-utérine évolue vers la réduction de la quantité de semence utilisée.

1.2. Puberté, œstrus et ovulation

La puberté : variabilité et détection (échographie)

Dans un troupeau, le déclenchement de la puberté se répartit généralement sur plusieurs semaines. La race, l'environnement et la conduite d'élevage peuvent influencer son moment d'apparition (EVANS et O'DOHERTY, 2001). Cette variabilité a pour conséquence qu'à un âge et à un poids similaires, les cochettes peuvent être à des stades physiologiques différents : infantiles, impubères, prépubères et pubères. Des ovulations sans aucun comportement d'œstrus ont été observées après dosage de progestérone chez des cochettes croisées (7 %) (MARTINAT-BOTTÉ et al., 1989) ; ce point a été confirmé par d'autres auteurs dans des races différentes (CHRISTENSON, 1981 ; ELIASSON, 1989). Un diagnostic de puberté a donc un réel intérêt et pourrait alors faciliter l'entrée des cochettes dans le troupeau de femelles productives.

Au cours du développement sexuel, vers 4-5 mois d'âge, l'accroissement des sécrétions ovariennes (PRUNIER, 1985) provoque une forte croissance de l'utérus (ERICES et SCHNURRBUSCH, 1979). Le poids de cet organe est multiplié par huit entre les stades infantile et pubère (PRUNIER et al., 1987). Un suivi échographique, réalisé 3 fois par semaine chez des cochettes âgées de 130 à 185 jours, a montré que les images échographiques sont très différentes entre les cochettes non pubères et pubères au moment de l'abattage (exploration par voie externe en plaçant la sonde linéaire dans le pli de l'aine). Chez les femelles non pubères, les images de l'utérus sont plus ou moins sombres et homogènes. Chez les cochettes pubères, elles sont contrastées ; les coupes utérines, plus ou moins grandes, sont distinctes. Le changement des images est brutal, 2 à 9 jours avant la puberté. C'est sur ces différences d'images que le diagnostic de puberté est basé. Le tableau 5 montre qu'avec une seule échographie, l'exactitude du diagnostic est de 98,4 %, soit moins de 2 % d'erreurs.

Le diagnostic de puberté est donc fiable et il permettra de détecter les cochettes non pubères parmi les pubères. Son intérêt dans différentes conduites d'élevage va être évalué.

Tableau 5 - Exactitude du diagnostic de puberté (DP) chez des cochettes LWh et croisées (une seule échographie ; MARTINAT-BOTTE, données non publiées)

Diagnostic (DP)	Exactitude (%)*	Effectif
DP+	99,2	359
DP-	96,4	139
DP	**98,4**	**498**

**(Nombre de diagnostics exacts/Nombre total de diagnostics) x 100*

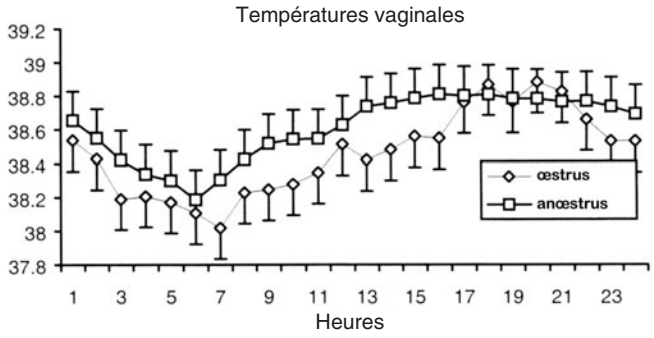
1.3. Oestrus et ovulation

1.3.1. Techniques de détection

La technique de référence de détection de l'œstrus est le réflexe d'immobilité de la truie en présence du verrat. Ce travail de détection représente une charge lourde et sa précision est déterminante pour l'organisation des inséminations.

GODRIE et al., (2001) ont proposé une approche automatisée de la manifestation d'œstrus via des mesures de température, de comportement et de résistivité du mucus vaginal. L'enregistrement des températures est fait à l'aide de capteurs posés au niveau de la base de l'oreille et du vagin, la température rectale est mesurée chaque jour et la température au voisinage de la truie est également enregistrée. L'analyse des variations de la température vaginale montre l'existence de rythmes circadiens et de variations dues à la prise alimentaire en période d'œstrus ou d'anœstrus (figure 1). Une élévation de la température, à la base de l'oreille ou rectale intervient 2,6 ± 0,19 jours avant l'apparition de l'œstrus. Cependant, cette observation ne correspond

pas à celle faite par d'autres auteurs (HENNE, 1991; JUNGE-WENTROP et HOLTZ, 1984 ; SOEDE et al., 1997). SOEDE et KEMP (1997) n'ont trouvé aucune relation entre les variations de la température vaginale et le moment d'ovulation. La maîtrise de la température environnante semble un facteur important et conditionne les variations de température corporelle. Des études complémentaires sur la relation entre la température de l'environnement et la température mesurée à la base de l'oreille sont nécessaires pour en interpréter les variations.



D'après GODRIE et al (2001).

Figure 1 - Variations journalières de la température vaginale de truies en œstrus (n=8) ou en anœstrus (n = 16).

La mesure quotidienne de la résistivité du mucus vaginal à l'aide d'une sonde montre une diminution significative de celle-ci deux jours avant l'apparition de l'œstrus (figure 2). Cependant, elle ne permet pas de connaître le moment d'ovulation (GODRIE et al., 2001; MARTINAT-BOTTÉ et al., 1997). Une mesure de ce type est longue à mettre en œuvre et nécessite des précautions sanitaires strictes, la sonde devant impérativement être désinfectée entre chaque animal.

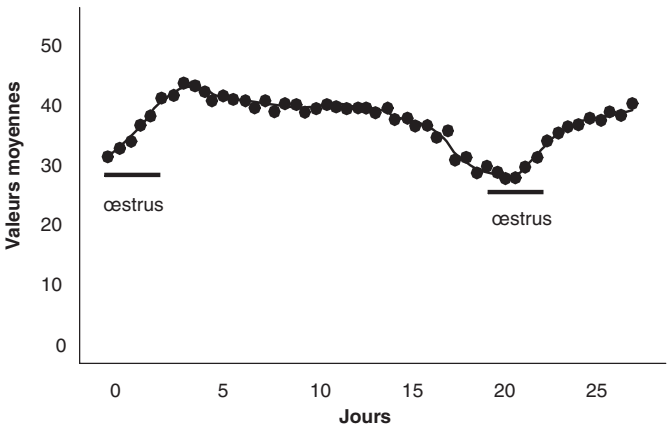
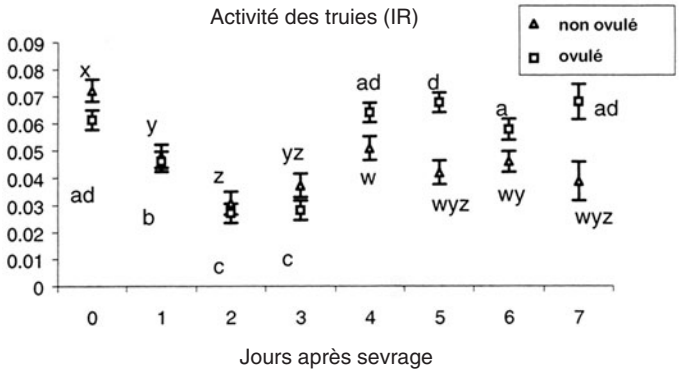


Figure 2 - Mesure de la résistivité du mucus vaginal au cours du cycle (n=10) : variations moyennes mesurées par la sonde Landata-Cobiporc (MARTINAT-BOTTE et al., 1997).

Les mesures de l'activité consistent à quantifier les changements de position de l'animal à l'aide d'un dispositif infrarouge. Ces mesures sont faites à l'aide de capteurs de position (animal couché ou debout au niveau de la case de contention) et cette méthode s'adresse donc à des truies bloquées. La venue en œstrus s'accompagne d'une augmentation de l'activité, mesurée en comparant la variation entre deux jours consécutifs (figure 3). L'analyse de moyennes journalières d'activité permet de classer correctement 80 % des truies venues en chaleur. Une analyse plus fine des pics d'activité permet d'affiner le diagnostic. Des différences importantes d'activité ont été observées entre types génétiques. Des mesures complémentaires sont donc nécessaires pour augmenter la sensibilité du dispositif.

Les méthodes d'acquisition de données de températures à la base de l'oreille et d'activité existent, mais la fréquence des mesures et les modes d'acquisition peuvent être améliorés. Les méthodes d'analyse et l'interprétation éventuellement



D'après GODRIE et al., (2001).

Figure 3 - Activité journalière moyenne après le sevrage (n = 200) mesurée avec des capteurs infra-rouge pour des truies ayant (groupes a, b, c, d) ou non ovulé (groupes w, x, y, z).

combinées de ces données sont à affiner pour être traduites en termes d'apparition de l'œstrus avec une précision supérieure à celle de la détection classique deux fois par jour. De tels outils permettraient une économie importante du temps de travail.

La visualisation de l'ovaire est possible chez la truie par échographie ou par endoscopie. Ces outils ont permis de déterminer le moment d'ovulation. L'outil échographique est de loin le plus utilisé (BRUSSOW et al., 1990 ; SOEDE et KEMP, 1997). Le dosage de la progestérone peut être utilisé comme alternative à ces méthodes pour dater à posteriori le moment d'ovulation avec une fiabilité équivalente à celle de l'échographie (TERQUI et al., 2000). Néanmoins, la mise en œuvre de ces outils suppose que plusieurs observations soient faites pour connaître avec précision le moment d'ovulation.

L'ensemble de ces paramètres conditionnent le succès de l'insémination et il est donc important de les mesurer avec précision.

1.3.2. Rappel de la variabilité de l'œstrus et de l'ovulation

Chez la truie, l'œstrus peut commencer à toute heure du jour et de la nuit. L'œstrus détecté à l'aide du verrat dure

50 heures en moyenne, mais des variations importantes sont notées (12 à 120 heures). Plusieurs facteurs interfèrent sur la durée de l'œstrus : la parité, la saison, l'intervalle tarissement - début oestrus, les conditions de logement et la race (SOEDE et KEMP, 1997). La durée de l'œstrus est en moyenne plus longue chez les femelles Meishan que chez celles de races européennes (BAZER et al., 1988).

En moyenne, l'ovulation apparaît 35 à 48 heures après le début des chaleurs (SOEDE et KEMP, 1997). Des différences existent entre races. L'ovulation intervient en moyenne 35 heures après le début de l'œstrus chez la cochette Large White et 10 heures plus tard chez la cochette Meishan (TERQUI et al., 2000). Chez des femelles croisées (étude réalisée dans 5 élevages), l'ovulation a commencé à des moments variables par rapport au début de l'oestrus : la plus précoce fut observée à 2 heures et la plus tardive à 88 heures (TERQUI et al., 2000). Une relation significative a été trouvée entre le jour d'apparition de l'oestrus après le tarissement et la période d'ovulation (WEITZE et al., 1994) mais cette relation n'a pas été confirmée par d'autres auteurs (NISSEN et al., 1997 ; TERQUI et al., 2000). La saison joue aussi sur le moment d'ovulation (BELSTRA et al., 2002).

De grandes variations ont été décrites dans la littérature en ce qui concerne la durée d'ovulation. L'intervalle entre la première et la dernière ovulation peut durer de moins d'une heure à 7 heures. En moyenne, elle est de 2 à 4 heures (FLOWERS et ESBENSHADE, 1993 ; SOEDE et al., 1998).

1.3.3. Relation insémination et ovulation, conséquences sur la fertilité et la prolificité

Lorsqu'une insémination en semence fraîche ou congelée est réalisée dans les 24 heures précédant l'ovulation, le taux de fécondation est supérieur à 90 %. Par contre, si l'insémination se situe 24 heures après l'ovulation, une chute importante de fertilité est observée (WABERSKI et al., 1994).

En élevage, les truies sont inséminées plusieurs fois au cours de l'oestrus et on est donc amené à retenir l'intervalle minimum entre l'ovulation et l'insémination. Dans deux études réalisées en élevage, un accroissement de prolificité a été noté lorsque l'insémination est réalisée près du moment d'ovulation (NISSEN et al., 1997 ; TERQUI et al., 2000). Le numéro de l'insémination « supposée fécondante » interfère aussi sur la prolificité. Ainsi la fréquence des portées de plus de 12 porcelets est plus élevée lorsque la première insémination est la plus proche de l'ovulation (TERQUI et al., 2000).

2. TECHNOLOGIES DE L'EMBRYON

Pour des raisons sanitaires, la législation internationale sur le transfert embryonnaire exige que seuls les embryons non pathogènes soient exportés avec une zone pellucide intacte (STRINGFELLOW et SEIDEL, 1998). Les embryons migrent à travers l'oviducte en 3 jours et entrent dans l'utérus au stade 4 cellules. Ils sortent de leur pellucide 6 jours après l'insémination, ils sont alors dans le tiers supérieur des cornes utérines. La période d'utilisation de ces différentes technologies est donc limitée à un développement très précoce de l'embryon.

2.1. Production

Les donneuses d'embryons peuvent être à des stades physiologiques différents au moment du traitement de superovulation : cochettes impubères, cochettes cycliques, truies gravides dont l'avortement est induit à l'aide d'analogues de prostaglandines, truies primipares ou multipares taries. Le traitement le plus souvent utilisé consiste à administrer de l'eCG (800 à 1500 UI) soit 24 heures après la dernière injection d'analogues de prostaglandines soit après l'arrêt du traitement progestagène (Régumate) soit après le tarissement ; de l'hCG ou du GnRH est injecté le plus souvent 72 à 80 heures plus tard. La réponse ovarienne dépend de la dose de eCG injectée, du génotype et de l'état physiologique des donneuses au moment du traitement. Une grande variabilité de réponse est souvent observée pour le taux d'ovulation, le nombre d'embryons collectés et le nombre d'embryons transférables, ceci par comparaison à des femelles non traitées. Lorsque la réponse ovarienne est élevée, la viabilité de ces embryons est compromise (HAZELEGER et KEMP, 2001; YOUNGS, 2001).

2.2. Collecte

La méthode la plus simple pour collecter les embryons est le lavage des oviductes ou des cornes utérines après abattage de la donneuse : le taux de collecte est élevé (80 %). Pour des utilisations répétées (2 à 3 collectes maximum par donneuse), il faut avoir recours à la collecte chirurgicale.

Après anesthésie, une laparotomie permet d'extérioriser le tractus génital, une perfusion est réalisée par les oviductes ou l'utérus. Les embryons sont récupérés à l'autre extrémité. Le taux de collecte est de 80 % (POLGE, 1982) mais cette méthode nécessite beaucoup de soins pour éviter la formation d'adhérences lors de collectes répétées. La collecte par endoscopie a été testée (BESENFELDER et al., 1997; BRÜSSOW et RATKY, 1996) ainsi que la collecte non-chirurgicale, mais ces 2 méthodes sont expérimentales. La dernière nécessite préalablement, par chirurgie, le raccourcissement des cornes utérines (HAZELEGER et KEMP, 2001).

2.3. Cryopréservation

A partir de 1972, il a été montré que l'embryon de porc était particulièrement sensible à un abaissement de la température, 15°C étant le premier stade léthal (POLGE, 1977 ; POLGE et al., 1974 ; WILMUT, 1972). Ensuite, trois voies successives ont été proposées pour cryopréserver l'embryon de porc : la congélation lente, la vitrification et, plus récemment, la vitrification ultra-rapide. Ces travaux sont synthétisés dans le tableau 6.

2.3.1. La congélation lente

Le principe est d'additionner des quantités limitées de cryoprotecteurs et d'abaisser lentement la température à l'aide d'un programmateur afin de permettre la déshydratation progressive des cellules et d'éviter la formation de cristaux de glace. Une vingtaine de porcelets sont nés de par le monde après transfert d'embryons congelés / décongelés

Tableau 6 - Taux de réussite après cryopréservation de l'embryon porcin

Méthode	Stade de l'embryon	Traitement l'embryon	Nb de mises bas /Nb de transferts	Nb de porcelets nés /Nb d'embryons transférés	Références
Congélation	2-4 cellules	Centrifugé + Délipidé	1 / 1	3 / 39	(NAGASHIMA et al, 1995)
	Blastocyste	Aucun	1 / 6	1 / 57	(FUJINO et al, 1993)
		Aucun	2 / 7	8 / 141	(MÖDL et al, 1996)
Vitrification	Morula et / ou Blastocyste	Cytochalasin B + Centrifugation + Pronase	9 / 11	61 / 330	(DOBRINSKY et al, 2001)
	Blastocyste épanoui	Aucun	1 / 3	4 / 64	(KOBAYASHI et al, 1998b)
		Aucun	3 / 15	11 / 338	(KOBAYASHI et al, 1998a)
Vitrification ultra-rapide	Morula	Aucun	8 / 10	26 / 200	(BERTHELOT et al, 2001)
		Aucun	7 / 10	35 / 200	(BERTHELOT et al, 2002a)
		Cytochalasin B + Centrifugation	3 / 4	16 / 115	(BEEBE et al, 2002)
	Blastocyste	Cytochalasin B + Centrifugation	1 / 5	5 / 180	(CAMERON et al, 2000)
		Aucun	29 / 40	168 / 800	(BERTHELOT et al, 2002b)

(FUJINO et al., 1993 ; HAYASHI et al., 1989 ; MÖDL et al., 1996). La présence de lipides a souvent été évoquée comme un obstacle à la congélation de l'embryon porcin (NAGASHIMA et al., 1995). Aucune des méthodes proposées n'a donné de résultats satisfaisants.

2.3.2. La vitrification

Les embryons sont placés dans un milieu contenant des concentrations élevées de cryoprotecteurs qui permettent la solidification de la solution sous forme amorphe, sans cristallisation, et plongés directement dans l'azote liquide. Cette descente rapide de température (3000°C / minute) leur permet de passer certaines températures critiques en limitant les dommages (MAZUR, 1990).

Chez le porc, cette technique a donné naissance à environ 75 porcelets après transfert d'embryons vitrifiés / réchauffés (DOBRINSKY et al., 2001 ; KOBAYASHI et al., 1998a et 1998b). Ces résultats indiquent que la vitrification est plus efficace que la congélation mais elle sera toujours une méthode difficile à mettre en oeuvre.

2.3.3. La vitrification ultra-rapide

STEPONKUS et al. (1990) ont proposé, chez la drosophile, une technique utilisant un abaissement ultra-rapide de la température (24000°C/min) qui permet de passer très rapidement les seuils critiques. Cette vitesse de refroidissement s'obtient en réduisant les volumes à quelques microlitres. Ce principe a été repris par une équipe danoise qui a mis au point une micro-paillette (Open Pulled Straw : OPS) (VAJTA et al., 1997). L'OPS est une paillette dont une des extrémités est suffisamment fine pour permettre la montée par capillarité des embryons baignant dans un microvolume de solution de vitrification (2 µl), et dont la paroi est assez mince pour permettre un refroidissement ultra-rapide. Plus de 250 porcelets sont nés après transfert d'embryons vitrifiés par cette technique (BEEBE et al., 2002 ; BERTHELOT et al., 2001 et 2002b ; CAMERON et al., 2000).

La vitesse de refroidissement apparaît être une des clefs pour préserver l'embryon de porc des dommages causés par l'abaissement de température. La méthode OPS est utilisable et reproductible pour vitrifier les morulae et les blastocystes porcins.

2.4. Transfert embryonnaire

Il s'agit de prendre les embryons d'une femelle donneuse et de les remettre dans une autre femelle dite receveuse. Les oestrus des donneuses et des receveuses doivent être plus ou moins synchrones (0 à 2 jours de décalage). Le transfert se fait selon le stade de l'embryon soit dans un seul oviducte soit dans une des deux cornes utérines.

2.4.1. Le transfert chirurgical

Après anesthésie de la receveuse, les embryons sont introduits soit par le pavillon de l'oviducte soit par le haut d'une des deux cornes utérines. Les résultats obtenus à partir d'embryons frais ou vitrifiés varient entre 60 et 80 % de receveuses gravides (BERTHELOT et al., 2002b ; CAMERON et al., 1989 ; MARTINAT-BOTTÉ et al., 1992 ; POLGE, 1982 ; WALLENHORST et HOLTZ, 1999). Plusieurs facteurs interfèrent sur le succès du transfert (YOUNGS, 2001). Plus récemment, une technique par endoscopie a été développée (BESENFELDER et al., 1997 ; STEIN-STEFANI et HOLTZ, 1987).

2.4.2. Le transfert non-chirurgical

Le principe du transfert non-chirurgical est de mettre les embryons dans l'utérus en passant par le col d'une receveu-

se vigile. Plusieurs méthodes nécessitant des instrumentations différentes ont été proposées pour transférer des embryons âgés de 5 à 6 jours (HAZELEGER et KEMP, 2001). Actuellement, deux techniques donnent des résultats prometteurs. La première permet de déposer des embryons frais dans le corps de l'utérus de receveuses multipares, les taux de gestation avoisinent 60 % (HAZELEGER et KEMP, 2001). La seconde permet de déposer les embryons plus haut dans les cornes utérines de receveuses nullipares ou multipares, 70 % des receveuses sont gravides après transfert d'embryons frais (MARTINEZ et al., 2002). Récemment, avec cette méthode, des gestations ont été obtenues après transfert de blastocystes vitrifiés (CUELLO et al., 2002).

En conclusion, la collecte des embryons après abattage de la donneuse et lavage des oviductes ou de l'utérus est facile et rapide à réaliser mais pour obtenir une à trois collectes chez une même donneuse, la chirurgie est nécessaire. La collecte non-chirurgicale est encore à l'étude chez la truie. Les embryons frais âgés de 4 jours et moins nécessitent un transfert chirurgical. A partir du stade morula, les avancées technologiques permettent d'envisager la vitrification ultra-rapide et le transfert non-chirurgical, rendant ainsi disponibles les échanges de génotypes rares ou exceptionnels en élevage porcin.

3. TECHNOLOGIES DE L'AVENIR

Un certain nombre de techniques, à des stades de développement plus ou moins avancés, seront décrites ici. Lorsqu'elles seront disponibles, elles représenteront des apports nouveaux pour la gestion de la reproduction dans les filières porcines ou de nouvelles perspectives de développement pour ces filières.

3.1. Le tri des spermatozoïdes X et Y

L'obtention à la mise bas d'animaux de sexe prédéterminé est une technique qui ouvre des perspectives importantes d'organisation de la filière. En effet, selon la spécialisation des élevages, sélectionneurs, multiplicateurs ou produits terminaux, l'objectif de production d'animaux de chaque sexe est différent.

La technologie de sexage actuellement utilisée consiste à utiliser la différence de teneur en ADN (3,6 % chez le porc) entre les spermatozoïdes porteurs du chromosome X ou Y pour les trier. Les spermatozoïdes sont marqués par un fluorochrome qui se fixe sur l'ADN et émet une fluorescence après excitation par un laser UV. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN et les spermatozoïdes porteurs de chromosomes X apparaissent donc plus brillants que les Y. Des dispositifs particuliers ont été mis au point pour adapter la cytométrie de flux au sexage de la semence. Les appareils les plus performants « high speed fluorescence assisted cell sorter » disponibles sur le marché permettent de trier 6 millions de spermatozoïdes X et Y à l'heure (JOHNSON, 2000). La pureté de chaque population triée est de 90 %. Cependant, la préparation de la semence pour le tri par marquage, l'addition de dilueurs nécessaires au passage dans le cytomètre, la pression importante utilisée pour obtenir des débits importants et le milieu de réception à la sortie du trieur contribuent à diminuer la qualité de la semence. Le produit final est très peu concentré et les quantités obtenues sont trop faibles pour être utilisées en insémination classique. Chez le porc, des mises bas ont eu lieu après réimplantation d'embryons produits par FIV avec de la semence sexée avec 97 % de produits du sexe attendu (ABEYDEERA et al., 1998). L'utilisation des techniques d'insémination intra-utérine permettant d'utiliser de faibles quantités de semence est en cours de validation pour l'utilisation de la semence sexée.

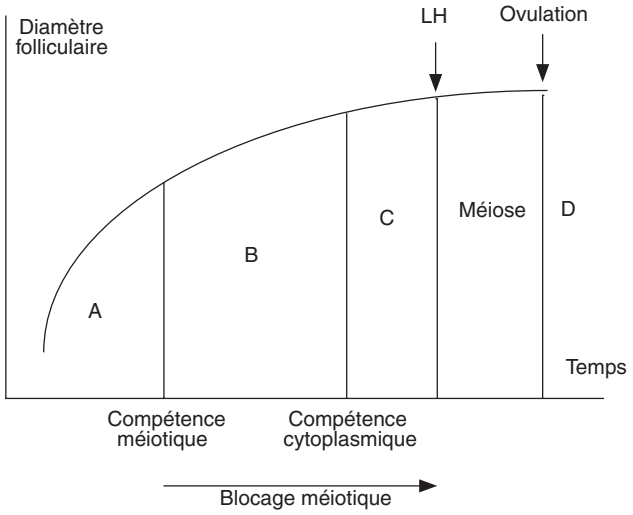
3.2. La production d'embryons in vitro

Le premier veau issu d'un embryon produit in vitro est né aux Etats-Unis en 1981 (BRACKETT et al., 1982). Depuis cette date, la technique de production d'embryons in vitro (PIV) a connu de nombreuses améliorations dans cette espèce. Elle se décompose en trois étapes : la maturation in vitro des ovocytes (MIV), leur fécondation in vitro (FIV) et le développement in vitro des embryons (DIV) jusqu'à un stade compatible avec leur transfert dans l'utérus d'une femelle receveuse. Chez le bovin, même si cette technique reste perfectible, elle est maintenant appliquée de manière commerciale et son importance est croissante dans les schémas de sélection, d'échange et de commercialisation de matériel génétique. Chez le porc, l'utilisation de la PIV reste expérimentale car la transposition directe des méthodes mises au point chez les bovins s'est avérée décevante, suite à des particularités de la physiologie des gamètes et des embryons.

3.2.1. La maturation in vitro

La maturation de l'ovocyte désigne l'évolution de son noyau depuis le stade de prophase I (vésicule germinale ou VG), auquel il était bloqué depuis la naissance, jusqu'au stade fécondable de métaphase II (MII), auquel a lieu l'ovulation. Cette maturation nucléaire (reprise de méiose) s'accompagne de remaniements cytoplasmiques qui préparent l'ovocyte à la fécondation et au développement précoce (MERMILLOD et al., 1999). In vivo, seuls les rares ovocytes contenus dans des follicules qui atteignent le stade préovulatoire sont concernés par cette maturation. En effet, la décharge d'hormone lutéinisante (LH) qui a lieu en début d'œstrus lève l'inhibition folliculaire de la méiose et prépare l'ovulation. La compétence de l'ovocyte à reprendre et poursuivre la méiose est acquise plus précocement au cours de la croissance folliculaire (figure 4). Si de tels ovocytes sont sortis de leurs follicules, ils reprennent spontanément leur méiose et sont ainsi sauvés d'une éventuelle atrésie. C'est le principe de la maturation in vitro.

Chez le porc, les ovocytes immatures sont prélevés dans les follicules en croissance présents à la surface des ovaires de femelles abattues. Chez la vache, il est possible de collecter ces ovocytes immatures sur des femelles vivantes par voie transvaginale sous guidage échographique « ovum pick up ou OPU ». Ceci offre l'avantage de pouvoir multiplier les collectes sur une même femelle (jusqu'à deux fois par semaine, sans stimulation hormonale). Cette technique n'est pas disponible chez le porc, où la collecte d'ovocytes nécessite-



L'ovocyte acquiert la compétence méiotique en début de croissance folliculaire, peu après la formation de la cavité antrale. Il est cependant maintenu bloqué en prophase méiotique par l'environnement folliculaire et poursuit ainsi sa différenciation jusqu'à l'acquisition de la compétence cytoplasmique (capacité à être fécondé et à se développer). Le pic préovulatoire de LH lève l'inhibition méiotique. La méiose reprend et se poursuit jusqu'au stade métaphase II où aura lieu l'ovulation et la fécondation. Selon la taille des follicules dans lesquels ils sont prélevés, les ovocytes sont donc incompétents (A), compétents pour la méiose mais pas pour le développement (B), compétents pour la méiose et le développement (C) ou matures (D).

Figure 4 - Représentation schématique de l'évolution de l'ovocyte au cours de la croissance folliculaire.

rait le recours à la chirurgie ou à l'endoscopie. La maturation nécessite une culture de 48 h chez le porc, alors que chez les ruminants, une culture de 24 h permet à la quasi totalité des ovocytes d'atteindre le stade MII. Cette durée reflète probablement un délai plus long pour la mise en place des éléments moléculaires régulant la maturation et une durée accrue de la condensation des chromosomes. D'un point de vue scientifique, ce délai représente un avantage car il permet une exploration plus détaillée des événements de la maturation.

Le milieu de base le plus largement utilisé est le milieu TCM199, tamponné au bicarbonate et additionné d'hormones (FSH, LH), de facteurs de croissance (EGF, IGFs) et de compléments complexes (sérum, fluide folliculaire). Le tableau 7 compare les effets de la FSH et de l'EGF sur la maturation nucléaire des ovocytes (MARCHAL et al., 2001a). La culture a lieu à 39°C dans une atmosphère d'air humide additionnée de 5 % de CO_2. La présence des cellules du cumulus oophorus, assises de cellules somatiques entourant la zone pellucide, est indispensable à la réussite de la maturation. En effet, ces cellules participent au métabolisme ovocytaire grâce à un réseau de jonctions perméables. Elles permettent par exemple de faciliter l'accumulation de glutathion dans l'ovocyte. Celui-ci sera indispensable lors de la décompaction du noyau du spermatozoïde et il participera à la protection du zygote contre les radicaux libres. L'addition de cystéamine, précurseur du glutathion, permet d'augmenter la concentration de glutathion cytoplasmique des ovocytes matures et améliore la fécondation (YAMAUCHI et NAGAI, 1999).

L'évolution de la maturation nucléaire est relativement facile à observer (fixation des ovocytes, coloration de la chromatine, observation microscopique). En revanche, il n'y a pas de critère morphologique fiable permettant d'évaluer le succès de la maturation cytoplasmique. Le seul critère disponible est fonctionnel, il s'agit de l'observation du taux de fécondation normale (monospermique) et du taux de développement (clivage, blastocystes) suite à cette fécondation. Un défaut de

Tableau 7 - Effet de la FSH, de l'EGF et du fluide folliculaire porcin sur la maturation nucléaire d'ovocytes porcins adultes et prépubères en culture (7 répliques, MARCHAL et al., 2001a)

	Prépubères		Adultes	
	n	% MII	n	% MII
199	203	32[a]	226	43[a]
EGF 10	206	62[b]	113	70[b]
FSH 400 *	186	66[b]	75	89[c]
pFF *	142	53[b]	138	75[b]
EGF + FSH	152	85[c]	237	89[c]
EGF + FSH + pFF *	126	85[c]	162	91[c]

L'EGF est actif sur les deux types d'ovocytes alors que la FSH et le fluide folliculaire ont une action plus marquée chez l'adulte. La combinaison EGF – FSH permet d'obtenir un taux maximum de maturation pour les deux types d'ovocytes. Dans ces conditions, le fluide folliculaire n'a pas d'effet supplémentaire.

** Différence significative entre adultes et prépubères (P < 0,05)*
[a,b,c] différence significative intra colonne (P < 0,05)
MII : Métaphase II, pFF : fluide folliculaire porcin

Tableau 8 - Développement in vitro après MIV et FIV d'ovocytes porcins collectés dans des follicules de taille différente (3 répliques, MARCHAL et al., 2002)

Taille Follic. (mm)	Ovocytes (n)	Blastocystes (% ± SD)	Blast. / MII (% ± SD)	Blast. / 2PN (% ± SD)	Cellules (mean ± SD)
< 3	135	3 ± 4[a]	7 ± 10[a]	23 ± 34[a]	58 ± 30
3 à 5	159	14 ± 6[b]	19 ± 7[b]	72 ± 28[b]	56 ± 18
> 5	86	23 ± 7[b]	27 ± 8[b]	83 ± 23[b]	53 ± 11

Le taux de développement après 8 jours est indiqué, ainsi que son rapport au taux de maturation et de fécondation et le nombre de cellules dans les blastocystes. La taille des follicules influence la proportion d'ovocytes capables d'atteindre le stade de blastocyste mais pas la qualité (nombre de cellules) de ces blastocystes.

[a, b] Différence significative (Chi carré, P < 0,05)
Blast. : blastocystes ; MII : métaphase II ; 2PN : 2 pronuclei

maturation cytoplasmique peut expliquer le contraste observé pour certains types d'ovocytes présentant des taux de maturation nucléaire élevés et des taux de développement faibles. Par exemple, certaines classes de taille folliculaire permettent d'obtenir de bons taux de maturation et peu de développement (tableau 8). Les ovocytes prélevés dans des follicules encore loin de l'ovulation semblent manquer d'une étape importante de leur différenciation pour pouvoir effectuer une maturation cytoplasmique normale (MERMILLOD et al., 1999, MARCHAL et al., 2002). De la même manière, les ovocytes collectés sur des cochettes prépubères présentent des taux de développement faibles comparés à celui qui est obtenu avec des ovocytes prélevés sur des truies cycliques, ceci malgré une maturation nucléaire efficace dans les deux cas (MARCHAL et al., 2001a).

La maturation cytoplasmique recouvre certains phénomènes connus, comme la migration des granules corticaux. Ces vésicules, dispersées dans le cytoplasme sous cortical, s'alignent contre la membrane plasmique au cours de la maturation. Elles jouent un rôle important dans le blocage de la polyspermie en excrétant leur contenu enzymatique suite à la fécondation, provoquant des modifications de la zone pellucide, la rendant résistante à la pénétration d'un ovocyte supplémentaire (blocage secondaire de la polyspermie). Ce mécanisme semble fonctionnel dans l'ovocyte de porc maturé in vivo ou in vitro (WANG et al., 1998), même pour des ovocytes de petits follicules, pourtant moins aptes à la fécondation (SUN et al., 2001), mais les modifications de la zone pellucide suite à l'exocytose des granules semblent longues à se mettre en place (TATEMOTO et TERADA, 1999). La dépolarisation de la membrane plasmique, suite à la fécondation, interdisant la pénétration d'un second spermatozoïde (blocage primaire de la polyspermie) pourrait également avoir un rôle important chez le porc et être altérée pour les ovocytes maturés in vitro.

Outre ces évolutions morphologiques connues, la maturation cytoplasmique recouvre également une différenciation moléculaire encore peu élucidée qui prépare la fécondation et le développement précoce. La compréhension de cette maturation moléculaire permettra de mettre en évidence des marqueurs qui faciliteront le suivi précis de l'évolution de l'ovocyte en fonction de son origine et des paramètres de culture et permettront donc une amélioration plus fine et plus rapide de cette technique. Une autre approche permettant d'améliorer la MIV serait la mise en place d'une étape préliminaire de culture des ovocytes dans un environnement imitant le blocage méiotique qu'ils connaissent dans le follicule en croissance. Cette étape leur permettrait de terminer leur différenciation et de se préparer à la maturation cytoplasmique. Des résultats intéressants ont été obtenus dans ce sens en utilisant des drogues qui bloquent l'activité des enzymes régulatrices de la reprise de méiose (MARCHAL et al., 2001b).

3.2.2. La fécondation in vitro

La polyspermie observée chez le porc semble liée à un défaut de préparation des ovocytes (maturation cytoplasmique). Cependant, lors de la fécondation in vivo, l'existence d'un délai entre l'arrivée du premier spermatozoïde et des suivants pourrait laisser plus de temps aux mécanismes de blocage de la polyspermie pour se mettre en place efficacement. In vitro, l'ovocyte se trouve d'emblée en présence d'une forte concentration de spermatozoïdes. La réduction du nombre de spermatozoïdes mis en présence des ovocytes lors de la FIV ne permet que de limiter très partiellement ce phénomène. D'autres mécanismes pourraient intervenir in vivo. L'oviducte pourrait en effet jouer un rôle régulateur de l'arrivée et de la capacitation des spermatozoïdes (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2001, HUNTER, 2002). En effet, l'extrémité caudale de l'isthme joue le rôle de réservoir à spermatozoïdes, modulant leur motilité, leur viabilité, leur transport et leur capacitation. Des résultats intéressants ont pu être obtenus en réalisant la FIV sur une monocouche de cellules tubaires, reproduisant ainsi l'environnement naturel de la fécondation. Le passage des spermatozoïdes sur une monocouche de cellules épithéliales tubaires pendant 3 h avant la fécondation, permet en effet d'augmenter de 70 % le taux de fécondation monospermique (ROMAR et al., 2001). Des composés contenus dans le fluide d'oviducte, provenant de la sécrétion des cellules tubaires, du fluide folliculaire ou du plasma séminal pourraient intervenir dans ce rôle régulateur de l'oviducte (KOUBA et al., 2000).

La composition des milieux utilisés a également son importance (ABEYDEERA, 2002). La concentration de calcium du milieu est déterminante pour la capacitation et la réaction acrosomiale des spermatozoïdes (FLESCH et GADELLA, 2000). Ce besoin important en calcium a conduit au développement de milieux sans phosphate ni bicarbonate, afin d'éviter les précipités (milieu TBM, tamponné au tris, ABEYDEERA, 2001) en présence de fortes concentrations de calcium. Cependant, un compromis serait peut-être à rechercher puisque la capacitation des spermatozoïdes est influencée par le bicarbonate et nécessite des phosphorylations de résidus tyrosine (FLESCH et al., 2001a et b). Des activateurs de mobilité, comme la caféine, sont couramment utilisés.

Des semences fraîches ou congelées peuvent être utilisées avec des succès comparables en adaptant les conditions de FIV et la concentration de spermatozoïdes (ABEYDEERA, 2002). Des spermatozoïdes triés (X et Y) ont également été utilisés avec succès et des naissances de porcelets de sexe prédéterminé ont été rapportées (ABEYDEERA et al., 1998).

3.2.3. Le développement in vitro

Lorsqu'ils sont placés en culture, les embryons de mammifères connaissent un blocage de leur développement à un stade précis, différent selon l'espèce. Chez le porc, le développement se bloque au stade 4 cellules. Ce n'est qu'au début des années 90 que l'introduction de nouvelles techniques de culture a permis d'obtenir le développement d'embryons porcins in vitro du stade une cellule au stade blastocyste. La plupart des naissances rapportées après transfert d'embryons PIV à ce jour concernent des embryons transférés à un stade précoce, après une courte période de culture post fécondation (ABEYDEERA, 2001). Néanmoins, le transfert des embryons au stade blastocyste offrirait de nombreux avantages. Il permet de transférer les embryons dans l'utérus, éventuellement par voie non chirurgicale, de sélectionner les embryons les plus aptes au développement, d'avoir recours au diagnostic préimplantatoire et d'augmenter les chances de survie après cryopréservation.

Le problème rencontré porte sur un taux de développement faible et une mauvaise qualité des embryons se traduisant par un nombre de cellules faible. L'amélioration des conditions de développement reposera sans doute sur l'ajustement des conditions physiques (BERTHELOT et TERQUI, 1996) et sur l'adaptation de la composition du milieu aux besoins de l'embryon en termes de facteurs de croissance, en tenant compte des récepteurs qu'il exprime et des facteurs présents dans la matrice (ANEGON et al., 1994, CHASTANT et al., 1994). Les besoins en sels minéraux, vitamines et nutriments doivent également être pris en compte. De nombreuses équipes se sont penchées sur le développement in vitro des embryons porcins et de nombreux milieux ont été testés dans ce but. Cependant, à ce jour, seules deux équipes ont réussi à obtenir des porcelets après transfert de blastocystes PIV. Des porcelets ont été produits en transférant des blastocystes développés en milieu SOF « Synthetic Oviduct Fluid », milieu dont la composition minérale et vitaminée a été calquée sur celle du fluide tubaire bovin, supplémenté de sérum bovin fœtal, avec cependant des rendements très faibles (MARCHAL et al., 2001a). Une autre équipe (KIKUCHI et al., 2002) a réussi à mettre au point deux milieux de développement qui, utilisés successivement, donnent de bons résultats tant en terme de taux (25 % de blatocystes) que de nombre de cellules et de viabilité. Le premier de ces milieux contient du pyruvate et du lactate et est utilisé pendant les deux premiers jours. Le second contient du glucose et est utilisé pendant les 4 jours suivants, cette combinaison offrant les meilleurs taux de développement. Ceci montre que les besoins de l'embryon sont évolutifs et que des conditions de développement performantes devront suivre cette évolution. Le passage du premier milieu pendant deux jours sur une monocouche de cellules tubaires améliore à la fois le taux et la qualité des embryons produits. Ceci montre encore l'importance de l'environnement maternel dans le succès de la production d'embryons. Les mêmes auteurs ont montré (KIKUCHI et al., 2002) que le fait de réduire la concentration d'oxygène à 5 % dans l'atmosphère de la maturation in vitro, permet d'augmenter le nombre de cellules des blastocystes obtenus après FIV et DIV. Il semble donc que les conditions de maturation, et donc la qualité des ovocytes, peuvent influencer leur fécondabilité mais également la qualité du développement des embryons.

En conclusion, la fécondation reste le point limitant majeur de la PIV porcine, suite au taux important de polyspermie après MIV et FIV. Le protocole de fécondation peut encore être amélioré mais il est difficile à l'heure actuelle de faire la différence entre les problèmes liés à la qualité des ovocytes et ceux qui résultent de conditions de fécondation inadaptées. La technique de développement in vitro a connu des améliorations récentes mais les évolutions futures passeront sans doute par la prise en compte de l'évolution des besoins de l'embryon préimplantatoire. Puisqu'il n'existe pas actuellement de technique simple pour collecter des ovocytes sur des femelles vivantes chez le porc, l'intérêt zootechnique de la PIV reste limité dans cette espèce. Cependant, la mise au point de la PIV est très importante pour le développement d'autres biotechnologies (transgenèse, clonage) et elle peut être utile également dans certains cas particuliers (test de semences, re-création de génotype après abattage…).

3.3. La sélection assistée par marqueurs

Plusieurs QTL « Quantitative Trait Loci » liés à des caractéristiques de production ou de résistance ont été identifiés chez le porc (BIDANEL et al., 2001). Dans ce domaine, les techniques in vitro pourraient induire une accélération de la sélection, bien que ce concept soit plus évident pour les espèces à temps de génération long (bovins). En effet, par biopsie (aspiration ou coupe), il est possible de collecter quelques cellules d'un embryon au stade morula ou blastocyste. Ces cellules peuvent être utilisées pour le génotypage de l'embryon, éventuellement sur plusieurs locus (PCR multiplex). Ne sont alors transférés que les embryons aux caractéristiques génétiques voulues. Cette méthode est d'ores et déjà utilisée commercialement chez la vache dans le but de déterminer le sexe des embryons. Grâce aux techniques in vitro, il serait même envisageable de produire les embryons avant l'âge de la puberté, voire avant la naissance (prélève-

ment d'ovocytes sur les ovaires d'un fœtus) et de gagner encore quelques mois sur l'intervalle de génération. Cependant, on se heurterait alors au problème de la moindre qualité des ovocytes pré-pubères, décrits chez le porc comme dans d'autres espèces.

3.4. La transgenèse

La transgenèse désigne l'introduction et l'intégration stable de gènes étrangers dans le génome d'une espèce ou la destruction (invalidation) stable d'un gène propre de cette espèce. Ces gènes ou ces invalidations, incorporés à la lignée germinale, seront transmis à la descendance. Il s'agit d'une méthodologie plus drastique que la sélection artificielle qui consiste à augmenter la fréquence d'allèles rares dans une population, grâce à des croisements orientés. Cependant, le résultat final est comparable puisqu'il s'agit d'une modification pérenne du patrimoine génétique de l'espèce. Cette technologie mérite donc d'être manipulée avec prudence et doit susciter d'importantes réflexions éthiques et zootechniques avant une mise en œuvre visant à diffuser une lignée au génome modifié. Les objectifs potentiels de cette technologie sont multiples. Ces approches ouvrent d'importantes perspectives dans la compréhension de la régulation génique des grandes fonctions physiologiques (étude de la fonction des gènes par invalidation ou surexpression). Cette stratégie sera indispensable à la compréhension des gènes identifiés lors du séquençage du génome porcin.

La transgenèse permet également de « construire » des lignées animales modèles pour l'étude de pathologies ou des lignées produisant des composés (protéines) à usage pharmacologique. Le développement de lignées animales produisant des tissus ou organes rendus compatibles avec la greffe chez l'homme (xénogreffe) s'inscrit dans cette direction. Le choix du modèle porcin pour ces approches biomédicales repose sur des similitudes anatomiques et physiologiques entre le porc et l'homme. Plusieurs lignées porcines exprimant des gènes humains impliqués dans la régulation de l'activation du complément ont été obtenues. Certaines permettent une tolérance accrue des tissus porcins par les primates.

Dans ce genre d'approche, il est important de tenir compte des risques sanitaires (transmission au receveur de pathogènes du donneur). Il est relativement aisé de se débarrasser de la plupart des pathogènes, mais les rétrovirus endogènes porcins pourraient présenter un problème important puisqu'ils sont intégrés au génome de l'hôte (LANGFORD et al., 2001). Certains virus « dormants » de l'organisme hôte pourraient être réactivés dans le contexte immunodéprimé du receveur de xenogreffe (MUELLER et al., 2002). Cependant, il semble que si ces rétrovirus sont capables d'infecter des cellules humaines cultivées en présence de tissus porcins (DENNER et al., 2001), la transmission in vivo ne puisse pas être mise en évidence chez l'animal, comme chez l'homme (KUDDUS et al., 2002). Enfin, la transgenèse pourrait être utilisée pour améliorer les caractéristiques des productions animales (résistance aux maladies, qualité de carcasse, production laitière, reproduction, digestion, excrétion…). Toutefois, ce dernier champ d'application impliquerait la diffusion à grande échelle des lignées modifiées et leur entrée dans la consommation. Ceci entraîne un devoir de précaution supplémentaire du point de vue de la conservation du patrimoine génétique de l'espèce et une étude approfondie de l'acceptabilité de telles manipulations par les consommateurs. Actuellement, ce dernier type d'application est exclu à l'INRA.

Plusieurs méthodes ont été utilisées afin d'introduire l'ADN exogène (WHEELER et WALTERS, 2001). Le transgène peut être introduit au stade blastocyste par injection dans le blastocœle de rétrovirus ou de cellules embryonnaires souches (cellules ES) génétiquement modifiés. Une partie seulement des cellules embryonnaires seront alors modifiées, mais si ces cellules participent à la formation des cellules germinales (futurs gamètes), l'animal mosaïque qui naîtra transmettra la modification génétique à tout ou partie de sa descendance. Le transgène peut également être introduit directement dans le zygote, généralement par micro injection dans les pronoyaux, après fécondation. Sauf exclusion du transgène de certaines cellules lors du développement, les animaux qui naîtront seront alors entièrement transgéniques (non mosaïques). C'est la méthode la plus « classique » de transgenèse. Des résultats récents montrent que le transgène peut également être introduit dans l'œuf par le spermatozoïde lui-même lors de la fécondation (LAVITRANO et al., 2002), ce qui représenterait certainement une des voies les plus simples de réaliser la transgenèse. Cette méthode serait particulièrement efficace avec plus de 80 % de transgéniques parmi les porcelets nés. Signalons toutefois que ce type d'approche a déjà été rapporté et fortement controversé par le passé (LAVITRANO et al., 1989 ; GANDOLFI et al., 1996). Ces différentes méthodologies ne permettent pas de prévoir ni de diriger le lieu d'insertion du transgène dans le génome hôte (insertion aléatoire) ni le nombre de copies insérées. Ces paramètres peuvent fortement influencer le niveau d'expression (séquences régulatrices en amont de l'insertion) et l'intégrité du produit (extinction de gènes endogènes suite à l'intégration aléatoire du gène exogène).

L'ADN inséré est une construction double brin comportant, en plus du gène d'intérêt, des séquences régulant son expression après insertion dans le génome. La régulation d'expression est quantitative. Elle peut également être ciblée (restreinte à un organe ou un tissu cible) grâce à l'utilisation de promoteurs (séquences régulatrices) prélevés sur des gènes dont l'expression est naturellement spécifique de cet organe ou de ce tissu. Par exemple, l'utilisation d'une séquence promotrice de caséine commandera l'expression du transgène dans la glande mammaire. La composition de la construction est importante car elle déterminera la fréquence d'insertion de la séquence dans le génome hôte ainsi que le niveau de son expression après insertion.

Le rendement très modeste des approches de transgenèse rend la production de porcs fondateurs extrêmement lourde et coûteuse (tableau 9). Cependant, une fois obtenus, leur mise à la reproduction permet d'établir rapidement une lignée transgénique homogène. Un certain nombre de lignées porcines transgéniques ont été décrites dans le monde, répondant à des objectifs variés (revue par WHEELER et WALTERS, 2001).

Tableau 9 - Exemple d'efficacité de la création de lignées porcines transgéniques par micro injection dans les pro-noyaux

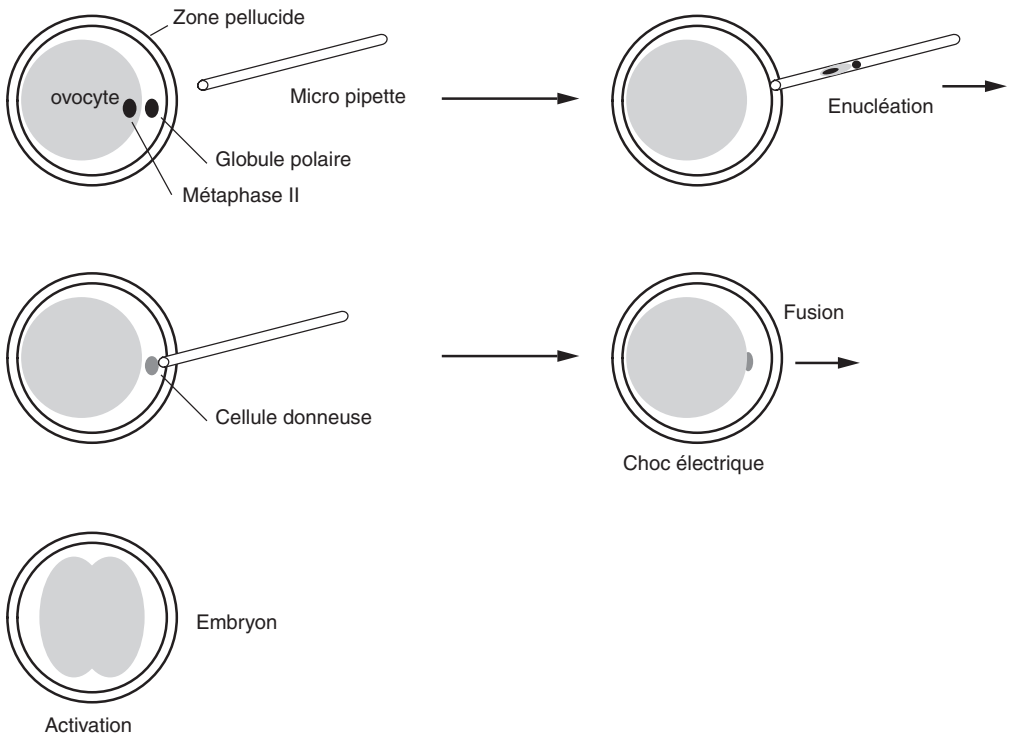
	hDAF– hCD59	CTLA4Ig
Donneuses	81	95
Œufs collectés	1691	2286
Œufs injectés	654	1054
Œufs transférés	570	1046
Receveuses	26	42
Mises bas	10	24
Porcelets	66	161
Positifs	2	8
Positifs / Transférés	0,35%	0,76%

Création d'une lignée double transgénique pour les gènes humains DAF et CD59, impliqués dans la régulation de l'activation du complément et d'une autre lignée porteuse du gène CTLA4Ig humain, impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire cellulaire. Un total de 176 donneuses et 68 receveuses a été utilisé. Seulement 10 porcelets transgéniques sont nés sur les 1616 embryons transférés (TERQUI et PLAT, non publié).

Le faible taux d'intégration du transgène contribue à la lourdeur de ces approches. En effet, pour obtenir la naissance d'un fondateur transgénique viable, il est nécessaire de mobiliser de nombreuses donneuses et de réaliser de nombreux transferts (tableau 9). Le diagnostic préimplantatoire de la présence du transgène (paragraphe 3.3) pourrait limiter le nombre de transferts nécessaires. Par ailleurs, le recours au transfert nucléaire (clonage) représente également une alternative intéressante à ces méthodes de transgenèse, offrant en théorie des rendements largement plus élevés et limitant donc le nombre de transferts nécessaires à l'obtention d'un fondateur.

3.5. Le clonage

Le clonage consiste à remplacer le génome d'un ovocyte receveur par celui d'une autre cellule (cellule donneuse). L'activation de cet œuf manipulé donnera naissance à un embryon qui possèdera le génome de la cellule donneuse (figure 5). La naissance de la brebis Dolly, en 1997, a montré que cette cellule donneuse pouvait être une cellule différenciée (cellule spécialisée d'un tissu). L'environnement constitué par le cytoplasme de l'ovocyte permet donc le retour à l'état totipotent d'un noyau différencié, dont l'expression des gènes était régulée afin de permettre à la cellule de réaliser une tâche précise. Grâce à cette technique, il est donc théoriquement possible de créer la copie génétique conforme d'un animal adulte. Il y a cependant au moins



Les opérations sont réalisées grâce à une micropipette reliée à un système démultiplicateur (micromanipulateur). L'ovocyte est maintenu par aspiration grâce à une pipette de diamètre légèrement inférieur au sien. Un ovocyte mûr est énucléé par aspiration du globule polaire et du matériel cytoplasmique sous-jacent. La cellule donneuse est placée dans l'espace péri vitellin, entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte et un choc électrique provoque la fusion des membranes. L'activation est poursuivie par des mécanismes chimiques visant à favoriser l'entrée de calcium dans l'ovocyte ou à diminuer l'activité des enzymes qui sont normalement bloquées suite à la fécondation.

Figure 5 - Clonage par transfert nucléaire

deux restrictions à cette théorie. D'une part, l'ADN mitochondrial de l'embryon reconstitué est celui de l'ovocyte receveur et non celui de la cellule donneuse. Cet ADN mitochondrial contient des gènes importants du métabolisme, ce qui peut avoir des conséquences phénotypiques. D'autre part, le phénotype d'un individu est l'expression de son génotype dans un contexte particulier d'environnement et de hasards du développement. Un clone est donc une copie génotypique partielle mais pas une copie phénotypique conforme.

Chez le porc, après quelques succès du clonage utilisant des cellules donneuses embryonnaires à la fin des années 80, les premiers résultats de transfert nucléaire utilisant des cellules différenciées n'ont été rapportés qu'en 2000 (revue par POLEJAEVA et al., 2000). Dans le cadre de la transgenèse, le clonage par transfert nucléaire représente un avantage certain. En effet, il est possible de modifier le génome des cellules en culture et de sélectionner les cellules ayant intégré la modification recherchée avant de les utiliser pour le clonage. Tout embryon produit ainsi sera donc porteur de la modification voulue et tout porcelet né sera transgénique. Cette approche permet donc théoriquement de réduire considérablement la lourdeur de la transgenèse, en limitant le nombre de naissances nécessaires à l'obtention d'un transgénique. Elle permet également d'en augmenter la précision puisque les cellules peuvent également être sélectionnées quant au site d'insertion et au nombre de copies insérées. Par ailleurs, elle donne accès à la recombinaison homologue, c'est-à-dire au remplacement d'un gène endogène par un autre ou par une séquence muette « knock out » ou extinction d'un gène. Très récemment, la naissance de porcelets transgéniques dans lesquels le gène de l'α-1,3 galactosyl transférase est inactivé a été rapportée (LAI et al., 2002). Ce gène est responsable de modification des épitopes de surface des cellules porcines. Il a été perdu chez les primates qui répondent donc aux cellules porcines par une réaction immunitaire contre les motifs galactosyl des cellules porcines, entraînant le rejet hyperaigu des xénogreffes. Cependant, le clonage par transfert nucléaire reste une technique très expérimentale dans toutes les espèces dans lesquelles il est pratiqué, en particulier chez le porc, et son rendement est extrêmement faible. Le principal verrou qui reste à lever concerne le dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'expression des gènes dans l'embryon reconstitué, menant à des anomalies graves de la gestation et du développement. Ceci donne lieu à un taux élevé d'anomalies menant à des avortements ou à des mortalités périnatales.

Le clonage est donc un outil expérimental intéressant pour la compréhension de la fonction des gènes « knock out » ou pour la production d'animaux génétiquement modifiés. Cependant, son utilisation pour la « duplication » d'animaux intéressants (transgéniques ou non) nécessitera au préalable une meilleure compréhension des mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression du génome au cours du développement.

CONCLUSIONS

Un certain nombre de techniques d'assistance à la reproduction sont maintenant bien au point et largement utilisées chez le porc (synchronisation et induction des chaleurs, insémination…) avec d'excellents résultats. D'autres techniques ont fait l'objet de développements et d'améliorations importants au cours des dernières années. Leur niveau de fiabilité les rend proches de l'utilisation de terrain (congélation de la semence, de l'embryon, transfert embryonnaire). D'autres améliorations sont en cours d'étude qui lèveront les derniers verrous limitant leur utilisation (transfert embryonnaire non chirurgical). Le déploiement de ces nouvelles technologies représentera un apport considérable en élevage porcin (diffusion des acquis génétiques, garanties sanitaires, stockages de patrimoines génétiques). D'autres technologies sont en cours d'étude ou de mise au point (fécondation in vitro, transgenèse, clonage). Leur développement portera probablement plus sur la diversification des productions (protéines à haute valeur ajoutée, tissus et organes pour greffes) et sur l'amélioration des connaissances de la physiologie de l'espèce que sur l'amélioration zootechnique des filières existantes. Utiliser la transgenèse pour modifier des caractéristiques de production pose en effet l'énorme problème de l'acceptabilité des produits génétiquement modifiés pour le consommateur. Pour le chercheur, le problème éthique posé par la modification du génome d'une espèce de rente constitue lui aussi un frein important des évolutions dans ce domaine. La possibilité de « stockage » de la diversité génétique à un instant donné (gamètes, embryons) permettra en partie de lever ce frein.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABEYDEERA L.R., 2001. Reprod. Suppl., 58, 159-173.
- ABEYDEERA L.R., 2002. Theriogenology, 57, 256-273.
- ABEYDEERA L.R., JOHNSON L.A., WELCH G.R., WANG W.H., BOQUEST A.C., CANTLEY T.C., RIEKE A., DAY B.N., 1998. Theriogenology, 50, 981-988.
- ANEGON I., CUTURI M.C., GODARD A., MOREAU M., TERQUI M., MARTINAT-BOTTE F., SOULILLOU J.P., 1994. Cytokine, 6, 493-499.
- BAZER F. W., THATCHER W. W., MARTINAT-BOTTÉ F., TERQUI M., 1988. J. Reprod. Fert., 83, 723-728.
- BEEBE L. F. S., CAMERON R. D. A., BLACKSHAW A. W., VERRALL R. G., 2002. 17th International Pig Veterinary Society Congress, Ames, Iowa, USA, 64.
- BELSTRA B. A., FLOWERS W. L., SEE M. T., 2002. Annual Swine Report of North Carolina State University.
- BERTHELOT F., TERQUI M., 1996. Reprod. Nutr. Dev., 36, 241-251.
- BERTHELOT F., LOCATELLI A., VENTURI E., MARTINAT-BOTTÉ F., 2002a. 18ème Réunion A.E.T.E., Rolduc (The Netherlands), Abstract 140.
- BERTHELOT F., MARTINAT BOTTE F., PERREAU C., TERQUI M., 2001 Reprod. Nutr. Dev., 41, 267-272.

- BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTÉ F., PERREAU C., LOCATELLI A., MANCEAU P., TERQUI M., 2002b. Journées Rech. Porcine, 34, 289-294.
- BESENFELDER U., MÖDL J., MÜLLER M., BREM G., 1997. Theriogenology, 47, 1051-1060.
- BIDANEL J.P., MILAN D., IANNUCCELLI N., AMIGUES Y., BOSCHER M.Y., BOURGEOIS F., CARITEZ J.C., GRUAND J., LE ROY P., LAGANT H., QUINTANILLA R., RENARD C., GELLIN J., OLLIVIER L., CHEVALET C., 2001. Genet. Sel. Evol., 33, 289-309.
- BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F., DRESSEL M.A., 1982. Biol Reprod, 27, 147-158.
- BRÜSSOW K. P. ,RATKY J., 1996. Reprod. Dom. Anim., 31, 711-715.
- BRÜSSOW K. P., RATKY J., BECKER F., 1990. Reprod. Dom. Anim., 25, 184-190.
- BUSSIÈRE J. F., BERTAUD G., GUILLOUET P., 2000. Journées Rech. Porcine en France, 32, 429-432.
- CAMERON R. D. A., BEEBE L. F. S., BLACKSHAW A. W., HIGGINS A., NOTTLE M. B., 2000. Austr. Vet. J., 78, 195-196.
- CAMERON R. D. A., DURACK M., FOGARTY R., PUTRA D. K. H., MCVEIGH,J., 1989. Austr. Vet. J., 66, 314-318.
- CHASTANT S., MONGET P., TERQUI M., 1994. Biol. Reprod., 51. 51, 588-596.
- CHRISTENSON R. K., 1981. J. Anim. Sci., 52, 821-830.
- COUROT M., BUSSIÈRE J., BERTAUD G., BRACONNIER O., FORGERIT Y., DESPRÈS P., MARTINAT-BOTTÉ F., 1995. Journées Rech. Porcine en France, 27, 63-65.
- CUELLO C., BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTÉ F., VENTURI E., VÁZQUEZ J. M., ROCA J., MARTÍNEZ E. A., 2002. Reproduction, abstract Series, 219, abstr. 52.
- DENNER J., SPECKE V., SCHWENDEMANN J., TACKE S.J., 2001. Ann. Transplant., 6, 25-33.
- DOBRINSKY J. R., NAGASHIMA H., PURSEL V. G., SCHREIER L. L., JOHNSON L. A., 2001. Theriogenology, 55, 303.
- ELIASSON L., 1989. J. Vet. Med., 36, 46-54.
- ERICES J. ,SCHNURRBUSCH U., 1979. Arch. Exper. Vet. Med., 33, 457-473.
- EVANS A. C. O. ,O'DOHERTY J. V., 2001. Livest. Prod. Sci., 68, 1-12.
- FLESCH F.M., GADELLA B.M., 2000. Biochim. Biophys. Acta, 1469, 197-235.
- FLESCH F.M., BROUWERS J.F., NIEVELSTEIN P.F., VERKLEIJ A.J., VAN GOLDE L.M., COLENBRANDER B., GADELLA B.M., 2001a. J. Cell. Sci., 114, 3543-3555.
- FLESCH F.M., WIJNAND E., VAN DE LEST C.H., COLENBRANDER B., VAN GOLDE L.M., GADELLA B.M., 2001b. Mol. Reprod. Dev., 60, 107-115.
- FLOWERS W. L. ,ESBENSHADE,K. L., 1993. J. Reprod. Fert., 48, 217-228.
- FUJINO Y., UJISATO Y., ENDO K., TOMIZUKZ T., KOJIMA T., OGURI N., 1993. Cryobiology, 30, 299-305.
- GANDOLFI F., TERQUI M. , MODINA S., BREVINI T.A., AJMONE-MARSAN P., FOULON-GAUZE F., COUROT M., 1996. Reprod. Fertil. Dev., 8, 1055-1060.
- GODRIE S., FRESON L., THYS B., GEERS R., 2001. Pig News Information, 22, 79N-86N.
- HAYASHI S., KOBAYASHI K., MIZUNO J., SAITOH K., HIRANO S., 1989. Vet. Rec., 125, 43-44.
- HAZELEGER W. ,KEMP B., 2001. Theriogenology, 56, 1321-1331.
- HENNE I., 1991. Monahtshefte Veterinar Medicine, 46, 674-676.
- HUNTER R.H., 2002. Reprod. Dom. Anim., 37, 186-190.
- JOHNSON L.A., 2000. Anim. Reprod. Sci., 60-61, 93-107.
- JUNGE-WENTROP S. , HOLTZ W., 1984. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, University of Illinois at Urbana Champaign, Illinois, USA, Abstr.
- KIKUCHI K., ONISHI A., KASHIWAZAKI N., IWAMOTO M., NOGUCHI J., KANEKO H., AKITA T., NAGAI T., 2002. Biol. Reprod., 66, 1033-1041.
- KOBAYASHI S., GOTO M., KANO M., TAKEI M., MINATO K., LEIBO S. P., 1998a. Cryobiology, 37, 436.
- KOBAYASHI S., TAKEI M., KANO M., TOMITA M., LEIBO S. P., 1998b. Cryobiology, 36,20-31.
- KOUBA A.J., ABEYDEERA L.R., ALVAREZ I.M., DAY B.N., BUHI W.C., 2000. Biol. Reprod., 63, 242-250.
- KRUEGER, C., RATH, D., JOHNSON, L. A., 1999. Theriogenology, 52, 1363-1373.
- KUDDUS R., PATZER J.F. 2nd, LOPEZ R., MAZARIEGOS G.V., MEIGHEN B., KRAMER D.J., RAO A.S., 2002. Transplantation, 73, 420-429.
- LAI L., KOLBER-SIMONDS D., PARK K.W., CHEONG H.T., GREENSTEIN J.L., IM G.S., SAMUEL M., BONK A., RIEKE A., DAY B.N., MURPHY C.N., CARTER D.B., HAWLEY R.J., PRATHER R.S., 2002. Science, impress.
- LANGFORD G.A., GALBRAITH D., WHITTAM A.J., MCEWAN P., FERNANDEZ-SUAREZ X.M., BLACK J., SHEPHERD A., ONIONS D., 2001. Transplantation, 72, 1996-2000.
- LAVITRANO M., BACCI M.L., FORNI M., LAZZERESCHI D., DI STEFANO C., FIORETTI D., GIANCOTTI P., MARFE G., PUCCI L., RENZI L., WANG H., STOPPACCIARO A., STASSI G., SARGIACOMO M., SINIBALDI P., TURCHI V., GIOVANNONI R., DELLA CASA G., SEREN E., ROSSI G., 2002. Proc. Natl Acad. Sci. U S A, 99, 14230-14235.
- LAVITRANO M., CAMAIONI A., FAZIO V.M., DOLCI S., FARACE M.G., SPADAFORA C., 1989. Cell, 57, 717-723.
- MARCHAL R., FEUGANG J.M., VENTURI E., TERQUI M., MERMILLOD P., 2001a. Theriogenology, 56, 17-29.
- MARCHAL R., TOMANEK M., TERQUI M., MERMILLOD P., 2001b. Mol. Reprod. & Dev., 60, 65-73.
- MARCHAL R., VIGNERON C., PERREAU C., BALI-PAPP A., MERMILLOD P., 2002. Theriogenology, 57, 1523-1532.
- MARTINAT-BOTTÉ F., BARITEAU F., FORGERIT Y., MACAR C., MOREAU A., TERQUI M., SIGNORET J. P., 1989. Journées Rech. Porcine en France, 21, 121-124.
- MARTINAT-BOTTÉ F., GUILLOUET P., MERCAT M. J., LANDREVIE J., TERQUI M., 1997. 5th International Conference on Pig Reproduction, Kerkrade, The Netherlands, Abstr. 86.
- MARTINAT-BOTTÉ F., PLAT M., PROCUREUR R., TERQUI M., 1992. In : International Symposium on Chinese Pig Breeds, Harbin, China., pp 561-564.
- MARTINAT-BOTTÉ F., QUESNEL H., PRUNIER A., TOURNUT J., TERQUI M., 1996. Rev. Méd. Vét., 147, 33-46.
- MARTINAT-BOTTÉ F., RENAUD G, MADEC F., COSTIOU P., TERQUI M., 1998. INRA Editions et Hoechst Roussel Vet, Paris, France, 104p.
- MARTINEZ E. A., GIL M. A., RIEKE A., ROCA J., VAZQUEZ J. M., DIDION B. A., DAY B. N., 2002. Theriogenology, 57, 549.
- MARTINEZ E. A., VAZQUEZ J. M., ROCA J., LUCAS X., GIL M. A., PARRILLA I., VAZQUEZ J. L., DAY B. N., 2001. Reproduction, 122, 289-296.
- MAZUR P., 1990. CellBiophys., 17, 5-9.
- MERMILLOD P., OUSSAID B., COGNIE Y., 1999. J. Reprod. Fertil. Suppl., 54, 449-460.
- MÖDL J., REICHENBACH H.-D., WOLF E., BREM G., 1996. Vet. Rec., 139,208-210.
- MUELLER N.J., BARTH R.N., YAMAMOTO S., KITAMURA H., PATIENCE C., YAMADA K., COOPER D.K., SACHS D.H., KAUR A., FISHMAN J.A., 2002. J. Virol., 76, 4734-4740.

- NAGASHIMA H., KASHIWAZAKI N., ASHMAN R. J., GRUPEN C. G., NOTTLE M. B., 1995. Nature, 374, 416.
- NISSEN A. K., SOEDE N. M., HYTTEL P., SCHMIDT M., D'HOORE L., 1997. Theriogenology, 47, 1571-1582.
- POLEJAEVA I.A., CHEN S.H., VAUGHT T.D., PAGE R.L., MULLINS J., BALL S., DAI Y., BOONE J., WALKER S., AYARES D.L., COLMAN A., CAMPBELL K.H., 2000. Nature, 407, 86-90.
- POLGE C., 1977. Ciba Foundation Symp., New York, 3-18.
- POLGE, C., 1982. In : Cole, D.J.A. and Foxcroft G.R. (Eds) , Butterworth Scientific, London, Nottingham, England, 277-291.
- POLGE C., WILMUT I., RAWSON L. E. A., 1974. Cryobiology, 11, 560.
- POUTRAIN J. M., 2002. Pas de Place pour le risque, 25ème anniversaire du Centre d'Insémination porcine du Québec, Drummonville, Québec, Canada, 1-9.
- PRUNIER A., 1985. Journées Rech. Porcine en France, 17, 123-138.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H., TIENTHAI P., SUZUKI K., FUNAHASHI H., EKWALL H., JOHANNISSON A., 2001. Reprod. Suppl., 58, 129-145.
- ROMAR R., COY P., CAMPOS I., GADEA J., MATAS C., RUIZ S., 2001. Anim. Reprod. Sci., 68, 85-98.
- SOEDE N. M. , KEMP B., 1997. J. Reprod. Fert., 52, 91-103.
- SOEDE N. M., HAZELEGER W., BROOS J., KEMP B., 1997. Anim. Reprod. Sci.., 47, 245-252.
- SOEDE N. M., HAZELEGER W., KEMP B., 1998. Reprod. Dom. Anim., 33, 239-244.
- STEIN-STEFANI J. , HOLTZ W., 1987. Theriogenology, 27, 278 (abst.).
- STEPONKUS P. L., MYERS S. P., LYNCH D. V., GARDNER L., BRONSHTEYN V., LEIBO S. P., RALL W. F., PITT R. E., LIN T. T., MACINTYRE R. J., 1990. Nature, 345, 170-172.
- STRINGFELLOW D. A. , SEIDEL G. E., 1998. In : 2nd Ed. Stringfellow D., Seidel S.M. USA , 67.
- SUN Q.Y., LAI L., BONK A., PRATHER R.S., SCHATTEN H., 2001. Mol. Reprod. Dev., 59, 192-198.
- TATEMOTO H., TERADA T., 1999. Theriogenology, 52, 629-640.
- TERQUI M., GUILLOUET P., MAUREL M.-C., MARTINAT-BOTTÉ F., 2000. Reprod. Nutr. Dev., 40, 393-404.
- THILMANT P., 1997. Ann. Méd. Vét., 141, 457-462.
- THILMANT P., 2001. Journées Rech. Porcine en France, 33, 151-156.
- VAJTA G., HOLM P., GREVE T., CALLESEN H., 1997. Acta Vet. Scand., 38, 349-352.
- WABERSKI D., WEITZE K. F., LIETMANN E., LUBBERT ZUR LAGE W., BORTOLZZO F. P., WILLMEN T., PETZOLDT R., 1994. Theriogenology, 41, 1367-1377.
- WALLENHORST S. , HOLTZ W., 1999. J. An. Sci., 77, 2327-2329.
- WANG W.H., MACHATY Z., ABEYDEERA L.R., PRATHER R.S., DAY B.N., 1998. Biol. Reprod., 58, 1357-1366.
- WATSON P. F. , BEHAN J. R., 2002. Theriogenology, 57, 1683-1693.
- WEITZE K. F., WAGNER-RIETSCHEL H., WABERSKI D., RICHTER L., KRIETER J., 1994. Reprod. Dom. Anim., 29, 433-443.
- WHEELER M.B., WALTERS E.M., 2001. Theriogenology, 56, 1345-1369.
- WILMUT I, 1972. J. Reprod. Fertil., 31, 513-514.
- WOLKEN A., RATH D., BORTOLOZZO F., WENTZ I., MARQUETTI A., 2002. Theriogenology, 57, 392.
- YAMAUCHI N., NAGAI T., 1999. Biol. Reprod., 61, 828-833.
- YOUNGS C. R., 2001. Theriogenology, 56, 1311-1320.