

BIOTECHNOLOGIES DE L'EMBRYON DANS L'ESPÈCE CANINE

EMBRYO BIOTECHNOLOGIES IN DOGS

Par Sylvie CHASTANT-MAILLARD⁽¹⁾⁽²⁾, Marie SAINT-DIZIER⁽³⁾, Christine VIARIS DE LESEGNO⁽²⁾,
Martine CHEBROUT⁽²⁾, Sandra THOUMIRE⁽²⁾, Karine REYNAUD⁽²⁾, Alain FONTBONNE⁽¹⁾

RÉSUMÉ

La biologie de l'ovocyte et de l'embryon canins, qui présentent des particularités spécifiques, est très mal connue. La chienne se distingue principalement par les modalités de reprise de la méiose ovocytaire : celle-ci n'a pas lieu au moment de l'ovulation, comme chez les autres femelles mammifères, mais dans l'oviducte 48 à 60 heures après l'ovulation. Les facteurs responsables de ce retard ne sont pas connus. Ceci explique sans doute pourquoi les taux de maturation *in vitro* obtenus à l'heure actuelle sont faibles (10 à 30 %). La collecte des ovocytes est aussi un facteur limitant majeur, en l'absence de protocole efficace d'induction des cycles et de superovulation. Les rendements de fécondation *in vitro* sont également faibles (10 %), avec un taux élevé de polyspermie. À l'heure actuelle, aucun chiot n'est encore né à partir d'un embryon produit *in vitro*. Quant aux embryons produits *in vivo*, leur collecte est difficile pour des raisons anatomiques et le rendement est limité par l'impossibilité d'induire des superovulations ; par ailleurs, leur transfert chez des femelles receveuses se heurte aux difficultés de synchronisation des ovulations entre la femelle donneuse et les receveuses, et la littérature ne décrit que six essais, qui ont abouti à la naissance de 45 chiots. Avec un très faible recours à la culture *in vitro*, quatre naissances de chiots ont été obtenues par clonage de cellules somatiques. Les biotechnologies de la reproduction sont donc largement en retard dans l'espèce canine, qui souffre d'un manque de travaux fondamentaux visant à mieux comprendre ses mécanismes physiologiques spécifiques. Ce déficit est d'autant plus dommageable que le chien prend une place croissante et pertinente en tant que modèle biomédical.

Mots-clés : ovocyte, embryon, *in vitro*, clonage, méiose.

SUMMARY

There is very little data available on the specificities of oocyte and embryo biology in bitches. The main difference with other mammals is the time of meiosis resumption: it does not occur before ovulation, but in the oviduct 48 to 60 hours later. The factors responsible for this delay are not known, which may explain why current in vitro maturation rates are so low (10 to 30%). Oocyte harvesting is also a major limiting factor, as there is no effective protocol for the induction of cycles and superovulation. In vitro fertilisation rates are equally low (10%), with a high rate of polyspermia. No puppy has yet been born from an embryo produced in vitro. As for embryos produced in vivo, their collection is difficult due to anatomical reasons and to the fact that superovulation cannot be induced. Embryo transfer to donor bitches is also hindered by difficulties to synchronise ovulations between donor and recipient bitches. Only 6 such trials have been reported in the literature, resulting in the birth of 45 puppies. In vitro cultures are very rarely used, and only four puppies were born from somatic cell cloning with only few hours of in vitro culture. Canine reproductive biotechnologies have thus largely fallen behind, due to a lack of fundamental research to improve our understanding of its specific physiological mechanisms. This deficit is all the more damaging that dogs are increasingly used as relevant biomedical models.

Key-words : oocyte, embryo, *in vitro*, cloning, meiosis.

(1) Unité de Reproduction, Centre d'études en reproduction des carnivores (CERCA)

(2) UMR 1198 INRA/ENVA/CNRS Biologie du Développement et Reproduction - École Nationale Vétérinaire d'Alfort - 7, avenue du Général de Gaulle - 94704 Maisons-Alfort Cedex

(3) AgroParisTech, 16 Rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05

INTRODUCTION

Chez un grand nombre d'espèces domestiques, en particulier chez les ruminants et y compris dans l'espèce humaine, les biotechnologies de la reproduction font largement appel à la manipulation des ovocytes et des embryons : transfert embryonnaire, production d'embryons *in vitro*, ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection; chez l'Homme), clonage et transgénèse (chez les animaux). Dans l'espèce canine, la technique de reproduction assistée la plus avancée est l'insémination artificielle. Les manipulations de l'embryon ne sont réservées qu'à quelques laboratoires dans le monde. Ce retard est dû à des particularités physiologiques de la chienne, mais aussi à des limites économiques et sociales. Le gain économique potentiel lié à la mise au point des biotechnologies de l'embryon est beaucoup plus faible chez la chienne qu'il ne l'a été chez les bovins ou les équins par exemple. De plus, il peut aussi sembler paradoxal de mettre au point des techniques avancées de reproduction dans cette espèce, alors que la plupart des pays souffrent de surpopulation canine et que la reproduction naturelle globale est considérée comme suffisante, voire excédentaire (Zawistowski *et al.* 1998; McNeil & Constandy, 2006; Purswell & Kolster, 2006). Enfin, le matériel biologique nécessaire aux expériences est rare : chez les espèces consommées pour leur viande, l'abattoir permet de collecter de très nombreux ovaires, ce qui n'est évidemment pas le cas chez la chienne.

Toutes ces difficultés concourent à ce que peu d'équipes dans le monde travaillent à la mise au point de nouvelles biotechnologies de la reproduction dans l'espèce canine. L'intérêt récemment apparu est associé à l'importance sociétale croissante prise par le chien, ainsi qu'aux politiques de préservation de la diversité génétique : le chien domestique représente un modèle des espèces de canidés en voie de disparition, telles que le lycaon, le loup rouge, le loup mexicain et plusieurs renards.

BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CANIN

La biologie de l'ovocyte et de l'embryon canins est différente de celle des autres mammifères et globalement très mal connue. Au lieu d'ovocytes haploïdes directement fécondables selon le modèle généralement adopté par les femelles mammifères, l'ovulation libère chez la chienne des ovocytes diploïdes, bloqués au stade prophase I de méiose (Andersen & Simpson, 1973). À chaque cycle, 6 à 12 ovocytes sont ovulés par chienne (Tsutsui *et al.* 1975; Lee *et al.* 2005; Reynaud *et al.* 2006). Les ovulations s'étalent sur 24, voire 36 heures (Boyd *et al.* 1993; Marseloo *et al.* 2004). Cette absence de synchronisation est sans doute partiellement responsable de la variabilité des stades embryonnaires observés au sein d'une même cohorte d'embryons (Bysted *et al.* 2001; Kim *et al.* 2002; Reynaud *et al.* 2005). Après l'ovulation, les ovocytes nécessiteront 48 à 54 heures de maturation dans l'oviducte pour atteindre le stade métaphase II et devenir fécondables (Tsutsui, 1989; Reynaud *et al.* 2005).

La fécondation a lieu dans l'oviducte entre 48 et 83 heures après l'ovulation. Les embryons au stade 2 pronocaux sont présents entre 72 et 124 heures (3-5 jours) après l'ovulation. Le stade 2 cellules s'observe entre 96-168 heures (4-7 jours) et les embryons mesurent à ce stade entre 100 et 180 microns (Tsutsui 1975; England *et al.* 2001). L'activation du génome embryonnaire, qui correspond à la mise en route de la transcription du génome embryonnaire, semble avoir lieu au stade 8 cellules, présent entre 122 et 288 heures (4,5 à 12 jours) après l'ovulation (Bysted *et al.* 2001) (*figure 1*). Le développement embryonnaire se déroule jusqu'à ce stade dans la lumière de l'oviducte. Vers 8,5 à 10 jours après l'ovulation, les embryons ont atteint le stade morula et commencent à passer dans l'utérus (Reynaud *et al.* 2006). Comparés à ceux des autres mammifères, les embryons canins passent donc un temps proportionnellement plus long dans l'oviducte : environ neuf jours pour une gestation de 63 jours, contre par exemple quatre jours chez la vache pour une gestation de 280 jours (Guillomot *et al.* 2001).

Les blastocystes, apparus vers J10-12, éclosent entre J16 et J20 : ils mesurent alors 2,5 mm. L'implantation a lieu peu après, entre J18 et J21 après l'ovulation (Gier 1950; Holst & Plemister, 1971; Concannon *et al.* 2001; Reynaud *et al.* 2005) (*figure 2*). Elle a donc également lieu tardivement par rapport à ce qui est observé dans d'autres espèces : l'implantation a ainsi lieu entre J16 et J19 après la fécondation chez la vache, pour une gestation de 280 jours (Guillomot *et al.* 2001).

Si le passage dans l'utérus et l'implantation sont effectivement plus tardifs pour l'embryon canin que dans les autres espèces, le développement embryonnaire par lui-même n'est pas particulièrement lent chez la chienne : cette idée communément admise provient du délai de 48 à 72 heures qui s'écoule entre l'ovulation et la fécondation. Dès lors que le déroulement du développement embryonnaire est décompté à partir de la fécondation, sa cinétique s'avère comparable à celle de l'embryon des autres mammifères.



Figure 1 : Embryons canins au stade 2- et 8-cellules collectés 112 heures après l'ovulation. Le cytoplasme est très sombre, du fait d'une grande richesse en gouttelettes lipidiques. Cliché UMR 1198 INRA/ENVA/CNRS.

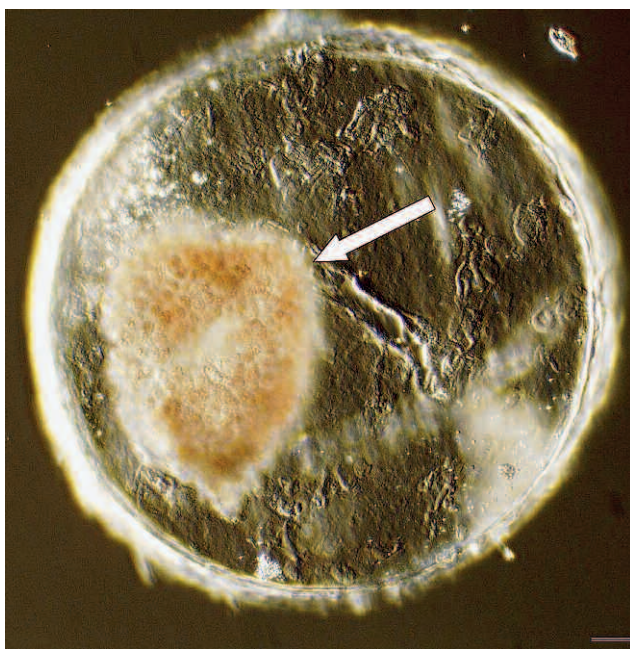


Figure 2 : Blastocyste canin collecté 14 jours après l'ovulation. La masse cellulaire interne, de coloration claire, est indiquée par la flèche. Cliché UMR 1198 INRA/ENVA/CNRS.

PRODUCTION D'EMBRYONS *IN VIVO*

La production d'embryons *in vivo* consiste à collecter les embryons par lavage de l'appareil génital d'une femelle après ovulation et insémination. La fécondation a donc lieu *in vivo*. Les embryons obtenus sont ensuite transférés chez des femelles receveuses dont le cycle est synchrone de celui de la donneuse.

Facteurs limitants

Plusieurs difficultés se présentent chez la chienne pour la mise au point de cette technique par ailleurs couramment employée chez les ruminants et chez l'Homme. Dans ces espèces, un traitement de superovulation est en général administré à la femelle donneuse pour augmenter le nombre d'embryons à collecter. Cependant, la chienne ne répond pas ou mal aux traitements hormonaux de superovulation classiquement utilisés (eCG/hCG; Archbald *et al.* 1990; Yamada *et al.* 1992). D'autre part, jusqu'à 9 jours après la fécondation, la collecte des embryons s'effectue par rinçage des oviductes et donc nécessairement par voie chirurgicale, donc invasive. Pour des stades plus tardifs, utérins, le rinçage des cornes utérines se réalise aussi par laparotomie, en raison de la conformation anatomique des cornes utérines et de la difficulté du cathétérisme cervical chez la chienne. Néanmoins, l'endoscopie cervicale, récemment développée pour l'insémination chez la chienne, ouvre de nouvelles perspectives (X. Lévy, comm.pers.). Bien que chirurgicales, ces collectes ont un rendement très faible: 30 à 40 % des embryons formés sont finalement récupérés (Archbald *et al.* 1990; Tsutsui *et al.* 2001b). Ce faible taux de collecte pourrait

être dû à l'hypertrophie très marquée de la muqueuse utérine lors des chaleurs chez la chienne, les embryons se trouvant alors piégés dans des replis de celle-ci. Les rendements augmentent nettement lors d'exérèse des trompes ou de l'utérus, mais ces techniques n'ont que peu d'intérêt en pratique (Tsutsui *et al.* 1989, 2001a et b).

À l'inverse, 80 à 90 % des embryons collectés sont viables (Tsutsui 1975; Tsutsui et Ejima, 1988; Shimizu *et al.*, 1990; Tsutsui *et al.* 2006). Sur cycles spontanés et sans superovulation, 6 à 8 embryons de bonne qualité morphologique sont ainsi collectés en moyenne par chienne. Les comptages de corps jaunes suggèrent que le nombre d'embryons récupérables varie avec la taille de la chienne: le nombre moyen de corps jaunes est de $5,5 \pm 0,3$ chez des femelles de petites races, contre $7,8 \pm 0,7$ dans les races moyennes (entre 10 et 20 kg) et $10,1 \pm 1,4$ chez les grandes races de plus de 20 kg (K. Reynaud & S. Chastant-Maillard, données non publiées).

Si l'augmentation du nombre d'embryons par femelle ne peut pas se faire à l'heure actuelle par la superovulation, une alternative pourrait être le raccourcissement de l'intervalle entre deux périodes de chaleurs, intervalle particulièrement long chez la chienne (environ six mois). Néanmoins, les protocoles hormonaux classiques d'induction des cycles (à base de progestogènes, œstrogènes et prostaglandines F2 alpha), efficaces dans les autres espèces, ne sont pas fiables chez la chienne. Des essais d'induction ont été conduits avec l'eCG (equine Chorionic Gonadotropin; anciennement PMSG) combinée à l'hCG (human Chorionic Gonadotropin), ou avec des dopaminergiques, mais les molécules les plus prometteuses sont les agonistes du GnRH (desloréline principalement). Les résultats préliminaires obtenus, suite à des traitements par des agonistes du GnRH sous forme d'implants sous-cutanés ou d'injections intramusculaires répétées, ouvrent de très intéressantes perspectives, mais ces résultats nécessitent absolument d'être confirmés (Kutzler 2005). Les implants de desloréline sont disponibles actuellement aux États-Unis et en Australie; un implant contenant un autre agoniste (azagly-nafaréline, GONAZON ND, Intervet, Angers, France) a obtenu très récemment une Autorisation de Mise sur le Marché en France, ce qui devrait permettre de mieux évaluer l'intérêt de ces molécules pour l'induction de l'œstrus chez la chienne.

La mise au point de ces protocoles serait également très utile pour la maîtrise des cycles des receveuses d'embryons. Le recrutement de ces femelles, dont le cycle doit être synchrone de la donneuse, est problématique du fait de l'impossibilité de maîtrise médicamenteuse. Le recrutement des donneuses se faisant donc sur cycles spontanés, un très grand effectif de femelles est nécessaire pour espérer pouvoir disposer de plusieurs femelles ovulant en même temps que la donneuse. Le décalage maximal entre donneuse et receveuse(s) compatible avec la gestation serait d'un à deux jours (Tsutsui *et al.* 2001a, 2001b).

Une alternative à la maîtrise des cycles des receveuses est la congélation des embryons. Or la richesse du cytoplasme

embryonnaire en lipides, chez la vache et chez le porc, détériore l'aptitude des embryons à supporter la congélation (Nagashima *et al.* 1995 ; Diez *et al.* 2001). Le cytoplasme des embryons canins étant particulièrement riche en lipides (*Figure 1*), son aptitude à supporter la congélation est probablement médiocre. On ne trouve dans la littérature qu'un seul essai de congélation d'embryons canins : 8 blastocystes (J13 après accouplement) congelés et transférés n'ont donné lieu à aucune naissance (Kim *et al.* 2002).

Résultats actuellement disponibles

Le transfert d'embryons est encore à un stade expérimental chez la chienne et recourt à la chirurgie, à la fois pour la collecte et le transfert. La littérature internationale permet de recenser cinq essais réalisés avec des embryons frais, dont quatre entre 1989 et 2006, issus du même laboratoire (*tableau 1*). Au total, les transferts ont concernés 57 femelles receveuses et 45 naissances ont été obtenues. À titre de comparaison, des collectes d'embryons sont pratiquées sur environ 6000 vaches par an en France (Ponsart *et al.* 2006). Les modalités de ces transferts chez la chienne sont très variées, en particulier en ce qui concerne le stade des embryons et le lieu de leur transfert. Du fait du médiocre rendement de la collecte par lavage utérin et inversement des difficultés techniques du transfert dans l'oviducte (la cathétérisation de l'infundibulum hyperhémié au moment de l'œstrus est délicate), Tsutsui *et al.* (2006) ont tenté de transférer 52 embryons collectés dans l'oviducte à des stades précoces (zygote à 8-cellules ; J5-7 après l'ovulation) dans l'utérus de 13 femelles receveuses. Quatre gestations furent obtenues, 6 chiots

sont nés. Ce principe de transfert intra-utérin d'embryons à des stades tubaires est classiquement pratiqué chez la Femme.

Intérêts potentiels

La mise au point de la transplantation d'embryons produits *in vivo* permettrait d'augmenter le nombre de descendants par femelle et de faire reproduire des femelles incapables de mener à bien une gestation. En particulier, chez les races de petite taille, un seul fœtus vient à terme, alors qu'un plus grand nombre d'embryons sont formés : le transfert des embryons à des stades précoces chez des femelles de race Beagle, aptes à mener à terme la gestation de plusieurs fœtus, permettrait d'augmenter le nombre de naissances. De façon similaire, les embryons pourraient être collectés chez des femelles Bulldog anglais, chez lesquelles le risque de césarienne et de mortalité néonatale est élevé, puis transférés chez des femelles à moindres complications obstétricales. Il serait intéressant d'étudier dans ces conditions les influences épigénétiques exercées sur le développement des chiots par la femelle qui aura mené la gestation et assuré l'allaitement.

La transplantation embryonnaire rendrait aussi possible le diagnostic de tares génétiques (diagnostic préimplantatoire, DPI) : après biopsie de quelques cellules embryonnaires chez les embryons collectés, des techniques de biologie moléculaire permettraient de rechercher la présence de gènes responsables de l'apparition de tares. Seuls les embryons indemnes de la tare recherchée seraient ensuite transférés. Chez le chien, les gènes responsables de plusieurs tares sont déjà connus et recherchés chez l'adulte (tels que ceux responsables de certaines rétinopathies héréditaires, surdités ou maladies nerveuses) et pourraient donc l'être chez l'embryon (Quéney *et al.* 2003).

Si les embryons canins s'avèrent congelables (par la technique d'Open Pulled Straw par exemple, Vatja *et al.* 1998), la technique autorisera les échanges et la conservation de matériel génétique.

PRODUCTION D'EMBRYONS *IN VITRO*

Collecte des ovocytes

À la différence des protocoles précédents, la fécondation a lieu à l'extérieur du tractus génital. Les ovocytes sont collectés chez la femelle, soit au sein des follicules, soit après ovulation, par rinçage de la lumière des oviductes, puis mis en contact *in vitro* avec des spermatozoïdes. Les embryons obtenus sont ensuite transférés chez des femelles receveuses.

La collecte des ovocytes peut s'effectuer par ponction de follicules préovulatoires (Yamada *et al.* 1992) (*figure 3*). Elle peut également se réaliser par section, à l'aide d'une lame de rasoir, des ovaires prélevés par ovariectomie (Reynaud *et al.* 2004) : cette modalité est celle qui est la plus couramment utilisée pour les études fondamentales menées sur l'ovocyte canin et sa maturation *in vitro*. À l'inverse, dans le cadre de la pratique clinique, cette technique ne présenterait un intérêt qu'immédiatement

	Chiennes donneuses	Chiennes receveuses	Nombre de gestations	Nombre de chiots nés
Embryons frais				
Kinney <i>et al.</i> 1979	28 embryons J14-15 (blastocystes)	5 receveuses (transfert intra-utérin)	2 gestations	2 + 1 chiots
Tsutsui <i>et al.</i> 1989	3 donneuses J9-12 (blastocystes)	3 receveuses (intra-utérin)	1 gestation	2 chiots
Tsutsui <i>et al.</i> 2001b	19 donneuses J8-11 (8 cell-blasto)	21 receveuses (intra-utérin)	12 gestations	25 chiots
Tsutsui <i>et al.</i> 2001a	19 donneuses J3-7 (zygote-8 cell)	15 receveuses (intra-tubaire)	4 gestations	11 chiots
Tsutsui <i>et al.</i> 2006	10 donneuses J5-6 (zygote-8 cell)	13 receveuses (intra-utérin)	3 gestations	4 chiots
Embryons congelés				
Kim <i>et al.</i> 2002	19 donneuses J8-13 post saillie 52 morulas - blastocystes	3 receveuses (transfert intra-utérin)	0	0

Tableau 1 : Liste exhaustive des essais de transfert embryonnaire d'embryons produits *in vivo* chez la chienne (essais publiés dans la littérature internationale).

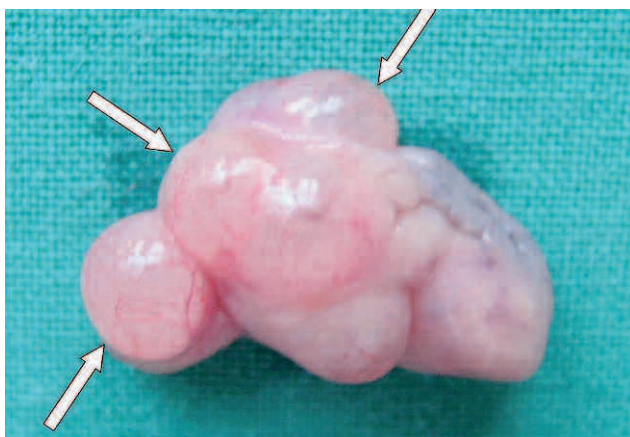


Figure 3 : Ovaire canin prélevé 12 heures avant l'ovulation. De nombreux follicules préovulatoires sont visibles (flèches).
Cliché UMR 1198 INRA/ENVA/CNRS.

après la mort d'une chienne ou éventuellement, avant un traitement stérilisant (chimio- ou radiothérapie). Des fragments corticaux de tels ovaires pourraient également être transplantés (avec ou sans cryoconservation) chez des souris SCID ou Nude, afin d'y reconstituer une folliculogénèse *in vivo*. Deux essais préliminaires ont été réalisés pour suivre le devenir de fragments ovariens canins cryoconservés, après greffe sous la capsule rénale ou dans la bourse ovarique de souris SCID (Metcalfé *et al.* 2001 ; Ishijima *et al.* 2006). Aucun développement de follicule au stade antral n'a été observé, mais le suivi des greffes n'a été effectué que pendant 30 à 56 jours. Or, seuls les follicules primordiaux et primaires survivent à la congélation/décongélation et la durée de la folliculogénèse complète, inconnue chez la chienne à cycle long, est quand même de l'ordre de 5 à 6 mois chez la femme et la vache (Gougeon, 1996 ; Driancourt *et al.* 2001). Les deux expériences montrent une survie du greffon, voire une production endocrinienne. À terme, si le stade de follicule antral ou préovulatoire peut être obtenu, ces follicules pourront être ponctionnés chez la souris elle-même. Les ovocytes collectés seront alors mis en maturation *in vitro*. Une alternative serait la folliculogénèse *in vitro* : cette technique permet de partir de fragments congelés/décongelés, d'obtenir la croissance des follicules primordiaux jusqu'au stade préovulatoire et l'ovulation d'un ovocyte fécondable chez la souris en 22 jours (Miyano, 2005). Elle n'est actuellement au point dans aucune autre espèce. Enfin, pour les cas de stérilisation précoce (pour traitement anticancéreux ou pour les chiennes guides d'aveugle ou d'aide aux handicapés), les fragments ovariens cryoconservés pourraient aussi être transplantés chez la chienne donneuse elle-même, par greffe orthotopique (position anatomique normale, autorisant une reproduction par saillie ou insémination) ou hétérotopique (sous la peau, par exemple, nécessitant ensuite une ponction folliculaire suivie de production d'embryons *in vitro*).

Néanmoins, l'ovariectomie ne peut être retenue comme technique de collecte d'ovocytes chez les chiennes saines qui doi-

vent rester des reproductrices à long terme. Chez les bovins, la collecte intrafolliculaire d'ovocytes est réalisée par ponction sous contrôle échographique ou, moins couramment, endoscopique (Ovum Pick-Up, OPU, Pieterse *et al.* 1988). Les vaches peuvent être ainsi prélevées pendant plusieurs mois, sans conséquence sur leur fertilité ultérieure (Gibbons *et al.* 1994). Cette technique n'a encore jamais été décrite chez la chienne, chez laquelle plusieurs obstacles anatomiques et physiologiques en compliquent la réalisation : la taille des follicules est faible (au maximum 7 mm de diamètre contre 20 mm chez la vache ou 45 mm chez la jument) ; la période pendant laquelle des follicules peuvent être ponctionnés est courte (moins d'une semaine sur les six mois d'un cycle).

La collecte d'ovocytes pourrait également être envisagée chez la chienne sous coelioscopie. Néanmoins, la bourse ovarique ne permet pas l'extériorisation de l'ovaire et devrait donc être incisée, geste susceptible de provoquer la formation d'adhérences et donc de gêner la répétition de cet acte. Que l'option soit échographique ou coelioscopique, elle nécessiterait l'anesthésie générale de la chienne (ce qui n'est pas nécessaire chez les grandes femelles), alors que l'inefficacité des protocoles de superovulation ne permet pas d'augmenter le nombre de follicules à ponctionner par cycle.

Après ponction folliculaire, les ovocytes collectés sont immatures (stade prophase I) et nécessitent donc une phase de maturation *in vitro* avant la mise en contact du sperme.

Maturation ovocytaire *in vitro*

La reprise de la méiose, du stade prophase I au stade métaphase II, est facilement obtenue *in vitro* chez les mammifères autres que la chienne (et la femme) : chez les bovins par exemple, 90 % des ovocytes sont au stade haploïde après 24 heures passées dans un milieu supplémenté (œstradiol, FSH, LH). Chez la chienne, après 72 à 96 heures de culture, et quel que soit le cocktail hormonal utilisé, seulement 5 à 10 % des ovocytes prélevés sur des ovaires en œestrus atteignent le stade métaphase I ou II. La plupart (60 %) n'ont même pas repris leur méiose (Saint-Dizier *et al.* 2001 ; Luvoni *et al.* 2005). Avec des ovocytes issus de follicules préovulatoires, le taux de maturation final est de 32 % (Yamada *et al.* 1992).

Cette inefficacité de la maturation *in vitro* chez la chienne est probablement à mettre en rapport avec le retard spécifique observé entre le pic de LH et la reprise de la méiose *in vivo*. La reprise de la méiose canine met probablement en jeu des facteurs tubaires. En outre, environ 25 % des ovocytes canins mis en culture dégénèrent : l'analyse des sécrétions de l'oviducte, au cours des 72 premières heures après l'ovulation, serait donc nécessaire pour identifier les facteurs nécessaires à la fois à la survie et à la reprise de la méiose des ovocytes. La mise en culture d'ovocytes prélevés sur des ovaires en œestrus, dans des oviductes maintenus en culture *ex vivo*, a permis d'augmenter les taux de métaphase jusqu'à 32 % (Luvoni *et al.* 2003), ce qui indique bien l'importance de ces facteurs tubaires.

Fécondation *in vitro*

La fécondation est obtenue *in vitro* en ajoutant les spermatozoïdes au milieu de culture contenant les ovocytes au stade métaphase II. Certains ont suggéré que la pénétration des spermatozoïdes était possible dans l'ovocyte canin à des stades immatures de méiose (Van der Stricht, 1923; Farstad *et al.* 1993). Si on peut obtenir une telle fécondation atypique chez les mammifères *in vitro*, du fait de l'immaturité des ovocytes prélevés en anœstrus (Saint-Dizier *et al.* 2001), l'observation par microscopie confocale, d'ovocytes collectés *in vivo*, a démontré que ce phénomène était exceptionnel *in vivo* et que la pénétration du spermatozoïde n'avait lieu que lorsque l'ovocyte canin avait atteint le stade métaphase II. Sur 112 ovocytes immatures collectés *in vivo* chez 50 chiennes inséminées, seuls trois appartenant à une même chienne étaient fécondés (Reynaud *et al.* 2005).

La fécondation présente *in vivo* un excellent rendement (voir plus haut) et la polyspermie n'est pas décrite. À l'inverse, *in vitro*, le taux de fécondation est très faible chez la chienne, entre 10 et 20 % (Mahi & Yanagimashi, 1976; Saint-Dizier *et al.* 2001), alors qu'il atteint couramment 80 à 90 % chez les bovins. De plus, le taux de polyspermie est particulièrement élevé *in vitro*: 47 % des ovocytes fécondés, avec entre 2 et 12 spermatozoïdes par ovocyte (3,3 en moyenne, Saint-Dizier *et al.* 2001).

La technique d'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) pourrait apporter une solution à la fois au faible taux de fécondation et au fort taux de polyspermie. Elle pourrait aussi être utilisée dans les cas d'oligo-asthénospermie qui est l'indication majeure de la technique en médecine humaine. Dans l'espèce canine, l'utilisation de l'ICSI n'a été décrite qu'une seule fois (Fulton *et al.* 1988). Malgré la bonne qualité du sperme, seulement 8 % des ovocytes micro-injectés ont formé deux pronoyaux. Leur développement ultérieur n'a pas été observé.

Développement embryonnaire

Chez les bovins, le taux de blastocystes moyen obtenu 7 jours après la fécondation *in vitro* est de 30 %, avec un taux de gestation de 50 %, après transfert chez des femelles receveuses (Van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). Chez la chienne, chacune des étapes de la production d'embryons *in vitro* reste du domaine de la recherche et aucune n'est au point. Le rendement de la culture *in vitro* d'ovocytes maturés et fécondés *in vitro* est actuellement très faible, au point qu'un seul travail décrit l'obtention d'un blastocyste après 9 jours de culture *in vitro* pour 217 ovocytes mis en maturation (Otoi *et al.* 2000). Un seul essai de transfert *in vivo* est également recensé: après la mise en maturation de 169 ovocytes au stade préovulatoire, leur fécondation *in vitro* puis le transfert de 90 embryons chez une seule receveuse, England *et al.* (2001) ont obtenu une gestation de trois conceptus, qui sont morts vers 21 jours de gestation. Le moindre résultat obtenu dans ce domaine chez la chienne appartient au domaine de l'exceptionnel. Ces faibles taux de développement révèlent la mauvaise qualité des ovocytes (au sens de leur apti-

tude à assurer le développement embryonnaire). Des études fondamentales sur l'ovocyte et sa maturation, *in vivo* et *in vitro*, revêtent donc une importance centrale.

Intérêts potentiels de la production d'embryons *in vitro*

La production d'embryons *in vitro* aurait pourtant plusieurs intérêts spécifiques, supplémentaires par rapport à ceux du transfert d'embryons obtenus *in vivo*: tout d'abord, une augmentation supérieure du nombre de descendants par femelle génétiquement intéressante (sous réserve du rendement et de la possibilité ou non d'obtenir des ovocytes hors de la phase œstrale). L'autre intérêt serait de permettre la reproduction d'animaux infertiles en saillie ou en insémination artificielle, en particulier de femelles souffrant de cycles anovulatoires.

CLONAGE

Quatre chiots, appartenant à deux portées, ont été obtenus à partir d'embryons issus du transfert de cellules cutanées auriculaires adultes (Lee *et al.* 2005; Parker *et al.* 2006; Jang *et al.* 2006). Les ovocytes ont été maturés *in vivo*, collectés par lavage des oviductes. Le taux de fusion est de 70-75 %, similaire à celui obtenu dans d'autres espèces. Les embryons ainsi reconstruits ont ensuite été transférés après une période de culture très courte (moins de 4 heures après activation) dans les oviductes de femelles receveuses. Celles-ci étaient des femelles spontanément synchrones des femelles donneuses.

Le rendement est beaucoup plus faible que chez les autres mammifères: dans l'étude de Lee *et al.* (2005), 1095 embryons reconstitués ont été transférés chez 123 chiennes receveuses. Deux chiots sont nés, l'un est mort à l'âge de 22 jours; le chiot survivant (un mâle lévrier afghan nommé SNUPPY pour Seoul National University Puppy) a été le premier chiot officiellement issu de clonage, avec un rendement de 0,1 %. Le rendement fut de 1,7 % pour Jang *et al.* (2006), qui ont obtenu la naissance de trois femelles lévrier afghan dans une même portée, à partir de 167 embryons reconstitués et transférés chez 12 femelles receveuses.

La difficulté d'obtention d'ovocytes canins au stade métaphase II a conduit à la réalisation de transferts nucléaires hétérospécifiques: des cellules adultes canines ont été transférées dans des caryoplastes issus d'ovocytes bovins. Ceux-ci représentent un matériel biologique abondant, facile d'accès (abattoir) et leur maturation est efficacement obtenue. Ces transferts interspécifiques permettent d'obtenir d'excellents taux de clivage (74 à 81 %) et un taux de développement embryonnaire tardif plus important que par fécondation *in vitro* (1,3 % morulas-0,4 % blastocystes; Westhusin *et al.* 2001, 2003; Murakami *et al.* 2005). Si des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules donneuses issues d'autres espèces (porcine, ovine, macaque), aucun développement à terme n'a jamais été obtenu (Dominko *et al.* 1999).

Intérêts potentiels

La principale application du clonage des canidés serait la sauvegarde de génotypes intéressants. Le clonage permettrait de créer une réplique d'un animal, permettant d'empêcher ses caractéristiques génétiques de disparaître à sa mort. Ceci pourrait s'appliquer aux canidés appartenant à des espèces en voie de disparition, aux champions de beauté ou de travail, ou aux chiens de particuliers lorsque les propriétaires y sont très attachés. Le clonage pourrait également permettre de générer des lots de chiens génétiquement identiques, qui représenteraient des outils puissants pour la recherche biomédicale (modèles de maladies humaines).

Néanmoins, quelle que soit l'application, il est illusoire aujourd'hui d'espérer obtenir des clones de chiens en grand nombre, compte tenu de la faiblesse du rendement. La maîtrise de la production d'embryons *in vitro* et de la synchronisation des ovulations seraient des avancées majeures. D'autre part, l'éventuel demandeur d'un clone canin, à la recherche d'une copie phénotypique, devra être prévenu de la variabilité des phénotypes entre animaux pourtant issus d'un même génotype de cellules donneuses. Les robes, la distribution des taches, les comportements et les performances zootechniques diffèrent entre animaux issus de la même source cellulaire (Chavatte-Palmer & Heyman, 2006). Ensuite, le clonage somatique fait apparaître, chez environ 30 % des fœtus et nouveau-nés bovins, des anomalies graves, regroupées sous le terme « *Large Offspring Syndrom* » ou plus récemment « *Abnormal Offspring Syndrom* ». Les anomalies observées sont principalement des hyperdéveloppements du placenta, une croissance excessive du fœtus, des anomalies cardiaques et immunitaires, des troubles de la croissance de certains organes (Renard & Chavatte-Palmer, 2004). Elles conduisent le plus souvent à l'avortement, la mort du clone dans les premières semaines de vie, voire à la mort de la femelle receveuse. Les mécanismes responsables restent pour l'instant inconnus. Aucune de ces anomalies n'a été décrite au cours des expériences de clonage canin, mais leur nombre très restreint ne permet pas de conclure. Enfin, en raison de l'importance « sociale » des chiens aux côtés de l'Homme et de leur place particulière au sein de la famille, le clonage canin pose des questions éthiques particulières.

TRANSGÉNÈSE

Des cellules ES-like (Embryonic Stem) ont été récemment décrites dans l'espèce canine (Hatoya *et al.* 2005). Ces cellules

sont dérivées de la masse cellulaire interne de blastocystes collectés 11 à 16 jours après accouplement. Après plusieurs passages en culture, elles restent indifférenciées, expriment des marqueurs cellulaires spécifiques, forment des corps embryoides capables de se différencier en plusieurs lignées cellulaires (neuronales, épithéliales, mélanocytaires et myocardiques). De telles cellules peuvent être génétiquement modifiées par recombinaison homologue, puis injectées dans des blastocystes pour former des chimères germinales.

L'avancement du séquençage du génome canin ouvre la perspective de la recombinaison homologue (Lindblad-Toh *et al.* 2005) et le chien se révèle un modèle pertinent de maladies humaines, génétiques ou acquises, avec un ensemble de symptômes plus proche de celui exprimé par l'Homme que celui retrouvé chez des animaux de laboratoire mutés. Récemment, l'utilisation d'un modèle spontané de myopathie de Duchenne chez des Golden Retrievers a démontré le bénéfice clinique d'une thérapie cellulaire : l'injection de mésangioblastes sains par voie intra-artérielle à des chiens atteints de la mutation a permis la réapparition de l'expression de la dystrophine et la récupération d'une morphologie et d'une fonction musculaires normales (Sampaolesi *et al.* 2006). Cet essai encourage à la mise en œuvre d'essais cliniques chez l'Homme. Pouvoir obtenir des chiens, modèles de maladies humaines, *via* des cellules ES recombinantes ou par clonage de cellules somatiques, représenterait une avancée biomédicale importante.

CONCLUSION

L'espèce canine présente des difficultés particulières en matière de biotechnologies de la reproduction. Pour progresser, des études fondamentales sont maintenant nécessaires pour comprendre la biologie de l'ovocyte canin, différente de nombreux titres de celle partagée par les autres espèces de mammifères. Jusqu'à récemment, d'aucuns ont cru pouvoir calquer sur la chienne les techniques de biologie du développement mises au point et efficaces chez les ruminants. Au sein même des carnivores, les techniques employées avec succès chez la chatte ne sont pas utilisables chez la chienne. La chienne se révèle désormais une « exception physiologique » en matière de reproduction et nécessite des études fondamentales spécifiques. Outre l'intérêt pour l'espèce canine elle-même, une meilleure compréhension conduisant à la maîtrise de la biologie du développement canin serait une étape fondamentale pour d'autres domaines, en particulier pour la recherche biomédicale.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'Académie Nationale de Médecine et l'École Doctorale ABIES pour le soutien apporté à C. V. de L., ainsi que le Service des Animaleries de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort pour l'entretien de nos Beagles.

BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, A.C. & Simpson, M.E. 1973. *The ovary and reproduction cycle of the dog (Beagle)*. Geron-X Inc, Los Altos.
- Archbald, L.F., Baker, B.A., Clooney, L.L., Godke, R.A. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. 1990. *Vet Med Small Anim. Clin.* 75 : 228-238.
- Boyd, J.S., Renton, J.P., Harvey, M.J., Nickson, D.A., Eckersall, P.D., Ferguson, J.M. 1993. *J Reprod Fert.* 47 Suppl : 101-105.
- Bysted, B.V., Dieleman, S.J., Hyttel, P., Greve, T. 2001. Embryonic development stages in relation to the LH peak in dogs. *J Reprod Fert.* 57 Suppl : 181-186.
- Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y. 2006. Les bovins clonés sont-ils normaux? *Point vét. Numéro spécial Reproduction des ruminants: gestation, néonatalogie et postpartum.* 37 : 40-44.
- Diez, C., Heyman, Y., Le Bourhis, D., Guyader-Joly, C., Degrouard, J., Renard, J.P. 2001. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology* 55 : 923-936.
- Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., McKusick, B., First, N.L. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod.* 60 : 1496-1502.
- Driancourt, M.A., Gougeon, A., Monniaux, D., Royère, D., Thibault, Ch. 2001. Folliculogenèse et ovulation. In *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. (ed Ch. Thibault & M.C. Levasseur) pp. 316-347. Ellipses editions marketing, Paris.
- England, G.C.W., Verstegen, J.P., Hewitt, D.A. 2001. Pregnancy following *in vitro* fertilisation of canine oocytes. *Vet Rec.* 148 : 20-22.
- Farstad, W., Hyttel, P., Grondahyl, C., Mondain-Monval, M., Smith A.J. 1993. Fertilization and early embryonic development in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Mol Reprod Dev.* 36 : 331-337.
- Fulton, R.M., Keskintepe, L., Durrant, B.S. et coll. 1998. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for the treatment of canine infertility. *Theriogenology* 48 : 366.
- Gibbons, J.R., Beal W.E., Krisher, R.L., Faber, E.G., Pearson, R.E., Gwazdauskas, F.C. 1994. Effects of once- versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42 : 405-419.
- Gougeon, A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17(2) :121-155.
- Guillomot, M. 2001. L'implantation du blastocyste. In *La reproduction chez les mammifères et l'Homme* (ed Ch. Thibault & M.C. Levasseur), pp 457-478. Ellipses editions marketing, Paris.
- Hatoya, S., Torii, R., Kondo, Y., Okuno, T., Kobayashi, K., Wijewardana, V., Kawate, N., Tamada, H., Sawada, T., Kumagai, D. et al. 2005. Isolation and characterization of embryonic stem-like from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 73 : 298-305.
- Ishijima, T., Kobayashi, Y., Lee, D. S., Ueta, Y. Y., Matsui, M., Lee, J. Y., Suwa, Y., Miyahara, K., Suzuki, H. 2006. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev.* 52 : 293-299.
- Jang, G., Kim, M.K., Oh, H.J., Hossein, M.S., Fibrianto, Y.H., Hong, S.G., Park, J.E., Kim, J.J., Kim, H.J., Kang, S.K. et al. 2006. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 67 : 941-947.
- Kim, Y.J., Kim, B.J., You, I.J. 2002. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. *J Vet Clin.* 19 : 73-79.
- Kinney, G.M., Pennycook, J.W., Schriver, M.D., Templeton, J.W., Kramer, D.C. 1979. Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod.* 20 : 96A.
- Kutzler, M.A. 2005. Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 64 : 766-775.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, E., Kim, H.J., Shamin, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436 : 641.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J. 3rd, Zody, M.C. et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438 : 803-819.
- Luvoni, G.C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Dom Anim.* 38 : 410-414.
- Luvoni, G.C., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2005. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 63 : 41-59.
- Mahi, C.A. & Yanagimashi, R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J Exp Zool.* 196 : 189-196.
- Marseloo, N., Fontbonne, A., Bassu, G., Rivière, S., Leblanc, B., Rault, D., Biourge, V., Chastant-Maillard, S. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Sao Paulo, Brésil. 4-6 août 2004, 75-77.
- McNeil, J. & Constandy, E. 2006. Addressing the problem of pet overpopulation: the experience of New Hanover County Animal Control Services. *J Public Health Manag Pract.* 12 : 452-455.
- Metcalfe, S.S., Shaw, J.M., Gunn, I.M. 2001. Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Reprod Fert.* 57 Suppl : 323-329.
- Miyano, T. 2005. *In vitro* growth of mammalian oocytes. *J Reprod Dev.* 51 : 169-176.
- Murakami, M., Otoi, T., Wongsrikeao, P., Agung, B., Sambuu, R., Suzuki, T. 2005. Development of interspecies cloned embryos in yak and dog. *Cloning Stem Cells* 7 : 77-81.
- Nagashima, H., Kashiwazaki, N., M., Ashman, R.J., Grupen, C.G., Nottle, M.B. 1995. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 374 : 416.
- Otoi, T., Murakami, M., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A., Une, S., Suzuki, T. 2000. Development of canine oocytes matured and fertilised *in vitro*. *Vet Rec.* 146 : 52-53.
- Parker, H.G., Kruglyad, L., Ostrander, E.A. 2006. DNA analysis of putative dog clone. *Nature* 440 : E1-E2.
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, T.A., Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30 : 751-762.
- Ponsart, C., Marquant-Le Guienne, B., Gérard, O., Guyader-Joly, C., Fréret, S., Humblot, P. 2006. Insémination et transfert d'embryons : perspectives. *Point vét. Numéro spécial Reproduction des ruminants: gestation, néonatalogie et postpartum* 37 : 26-31.
- Purswell, B.J. & Kolster, K.A. 2006. Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology* 66 : 510-513.
- Queney, G. 2003. La détection des maladies génétiques grâce aux outils de biologie moléculaire. Dans : *L'éleveur et l'élevage canin : aujourd'hui et demain*. In *Proc. Société Française de Cynotechnie*, Nantes, 12-13 décembre, pp. 197-202.
- Renard, J.P. & Chavatte-Palmer, P. 2004. Le clonage de l'animal et son apport en recherche vétérinaire. *Bull Acad Vét France* 157 : 5-15.

- Reynaud, K., Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S. 2004. In vitro maturation and fertilization of canine oocytes. In *Methods Mol Biol, Germ cell protocols 53* (ed H. Schatten), pp 255-272. Humana Press, Totowa.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Thoumire, S., Chebrou, M., Viaris de Lesegno, C., Chastant-Maillard, S. 2005. *Reproduction* 130: 193-201.
- Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Viaris de Lesegno, C., Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S. 2006. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis : a review. *Theriogenology* 66: 1685-1693.
- Saint-Dizier, M., Renard, J.P., Chastant-Maillard, S. 2001. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 121: 97-105.
- Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.L., Galvez, B.G., Barthelemy, I. *et al.* 2006. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444: 574-579.
- Shimizu, T., Tsutsui, T., Murao, I., Orima, H. 1990. Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Jpn. J Vet Sci.* 52: 1273-1275.
- Tsutsui, T. 1975. Ovulation rate and transuterine migration of fertilized ova. *Jpn J Anim Reprod.* 21: 98-101.
- Tsutsui, T. 1989 Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil.* 39 Suppl: 269-275.
- Tsutsui, T. & Ejima, H. 1988. Experimental induction of superfecundation in the dog. *Jpn J VetSci.* 50: 581-583.
- Tsutsui, T., Shimada, K., Nishi, M., Kubo, N., Murao, I., Shimizu, T., Ogasa, A. 1989. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn J Vet Sci.* 51: 797-800.
- Tsutsui, T., Hori, T., Kawakami, E. 2001a. Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fert.* 57 Suppl: 309-314.
- Tsutsui, T., Hori, T., Okazaki, H., Tanaka, A., Shiono, M., Yokosuka, M., Kawakami, E. 2001b. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci.* 63: 401-405.
- Tsutsui, T., Hori, T., Endo, S., Hayama, A., Kawakami, E. 2006. Intrauterine transfer of early canine embryos. *Theriogenology* 66: 1703-1705.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 51: 53-58.
- Van der Stricht, O. 1923. Etude comparée des ovules de mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse. *Arch Biol.* 33: 229-300.
- Van Wagtenonck-de Leeuw, A.M. 2006. Ovum Pick-Up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65: 914-925.
- Westhusin, M.E., Burghardt, R.C., Ruglia, J.N., Willingham, L.A., Liu, L., Shin, T., Howe, L.M., Kraemer, D.C. 2001. Potential for cloning dogs. *J Reprod Fert.* 57 Suppl: 287-293.
- Westhusin, M., Hinrichs, K., Choi, Y.H., Shin, T., Liu, L., Kraemer, D. 2003. Cloning companion animals (horses, cats and dogs). *Cloning and Stem Cells.* 5: 301-317.
- Yamada, S., Shimazu, Y., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K., Toyoda, Y. 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol Reprod* 46: 853-858.
- Zawistowski, S., Morris, J., Salman, M.D., Ruch-Gallie, R. 1998 Population dynamics, overpopulation, and the welfare of companion animals: new insights on old and new data. *J Appl Anim Welf Sci.* 1: 193-206.

