

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	3
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX	7
INTRODUCTION	9
1. Matériels et méthodes.....	21
1.1. Récolte et sélection des ovaires	21
1.2. Préparation histologique	21
1.3. Mesure des diamètres folliculaires et ovocytaires	23
1.4. Classification des stades folliculaires	24
1.5. Analyse statistique	26
2. Résultats	29
2.1. Croissance folliculaire	29
2.2. Croissance ovocytaire.....	30
2.3. Relation entre la croissance folliculaire et ovocytaire.....	31
2.3.1. Selon le stade folliculaire	31
2.3.2. Tous stades folliculaires confondus.....	40
2.4. Apparition et évolution de l'épaisseur de la zone pellucide	43
2.4.1. Selon le stade folliculaire	43
2.4.2. Tous stades folliculaires confondus.....	44
3. Discussion	47
3.1. Croissances folliculaire et ovocytaire.....	47
3.1.1. Croissance folliculaire	47
3.1.2. Croissance ovocytaire.....	50
3.2. Formation de l'antrum	53
3.2.1. Rôles et origine de l'antrum	54

3.2.2.	Apparition de l'antrum lors de la folliculogenèse.....	56
3.2.3.	Relation entre la formation de l'antrum et l'acquisition de la compétence méiotique.....	57
3.3.	Relation entre la croissance folliculaire et ovocytaire	59
3.3.1.	Croissance biphasique de l'ovocyte.....	59
3.3.2.	Relation entre l'acquisition du diamètre ovocytaire maximal et la formation de l'antrum	61
3.3.3.	Relation entre le diamètre ovocytaire et l'acquisition de la compétence méiotique.....	62
3.4.	Apparition et évolution de l'épaisseur de la zone pellucide	63
3.4.1.	Composition et structure de la zone pellucide	63
3.4.2.	Rôles de la zone pellucide.....	64
3.4.3.	Apparition de la zone pellucide lors de la folliculogenèse et origine	66
3.4.4.	Dimensions de la zone pellucide chez la chatte.....	68
3.4.5.	Perspectives.....	68
3.5.	Quelques remarques sur les follicules polyovocytaires	69
CONCLUSION		77
BIBLIOGRAPHIE.....		81
ANNEXES		91

LISTE DES ABBREVIATIONS

bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
CITES	<i>Convention on International Trade of Endangered Species</i>
DES	Diéthylstilbestrol
eCG	<i>equine Chorionic Gonadotropin</i>
FIV	Fécondation <i>In Vitro</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GV	<i>Germinal Vesicle</i>
GVBD	<i>Germinal Vesicle BreakDown</i>
hCG	<i>human Chorionic Gonadotropin</i>
HES	Hématoxyline Eosine Safran
IA	Insémination Artificielle
ICSI	<i>Intra-Cytoplasmic Sperm Injection</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
MIV	Maturation <i>In Vitro</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
TE	Transfert Embryonnaire
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
ZP	Zone Pellucide

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Chronologie de la formation des ovogonies et des ovocytes chez la chatte au cours du développement embryonnaire et de la période post-natale (<i>d'après Mauléon, 1969</i>).....	10
FIGURE 2 : Représentation schématique de l'importance relative des différents facteurs au cours du développement folliculaire (<i>d'après Monniaux et al., 1997</i>).....	12
FIGURE 3 : Sécrétion de gonadotropines et facteurs de rétrocontrôle au cours des phases de recrutement, sélection et dominance (<i>d'après Driancourt et al., 2001</i>).....	14
FIGURE 4 : Représentation schématique de l'évolution morphologique du follicule ovarien au cours de la folliculogénèse (<i>d'après Picton et Gosden, 1999</i>).....	15
FIGURE 5 : Concentration sérique en LH en fonction du nombre de copulations chez la chatte (<i>d'après Concannon et al., 1980</i>).....	16
FIGURE 6 : Ovaires de chatte après exérèse.....	22
FIGURE 7 : Repères de mesure des diamètres ovocytaires et folliculaires.....	23
FIGURE 8 : Représentation schématique de la classification des stades folliculaires Utilisée.....	26
FIGURE 9 : Follicules primordiaux de chatte en microscopie optique	32
FIGURE 10 : Follicules primaires de chatte en microscopie optique.....	33
FIGURE 11 : Follicules secondaires de chatte en microscopie optique.....	34
FIGURE 12 : Follicules pré-antraux de chatte en microscopie optique.....	35
FIGURE 13 : Follicules antraux de chatte en microscopie optique.....	36
FIGURE 14 : Follicules polyovocytaires de chatte en microscopie optique.....	37
FIGURE 15 : Relation entre les diamètres folliculaires et ovocytaires dans les premiers stades de la folliculogénèse (follicules primordiaux à jeunes follicules antraux).....	38
FIGURE 16 : Evolution des diamètres folliculaires et ovocytaires en fonction du stade folliculaire (follicules primordiaux à jeunes follicules antraux).....	39

FIGURE 17 : Evolution du pourcentage du volume folliculaire représenté par l'ovocyte (follicules primordiaux à jeunes follicules antraux).....	40
FIGURE 18 : Répartition de l'ensemble des follicules mesurés en fonction de leur taille.....	41
FIGURE 19 : Relation entre les diamètres folliculaires et ovocytaires tous stades folliculaires confondus.....	42
FIGURE 20 : Epaisseur de la zone pellucide au cours du développement folliculaire.....	45
FIGURE 21 : Epaisseur de la zone pellucide en fonction du diamètre ovocytaire.....	46

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Correspondance entre la classification folliculaire utilisée dans notre protocole et la classification proposée par Pedersen et Peters (1968).....	25
TABLEAU 2 : Diamètre folliculaire des premiers stades folliculaires.....	30
TABLEAU 3 : Diamètre ovocytaire des premiers stades folliculaires.....	31
TABLEAU 4 : Epaisseur de la zone pellucide dans les premiers stades folliculaires.....	44
TABLEAU 5 : Comparaison des diamètres folliculaires moyens selon le stade folliculaire chez 4 espèces de mammifères (souris, hamster, truie et femme) (<i>d'après Griffin et al., 2006</i>).....	49
TABLEAU 6 : Comparaison des diamètres du follicule pré-ovulatoire chez 8 espèces de mammifères (souris, rat, hamster, lapine, chienne, chèvre, vache et femme) (<i>d'après Monniaux et al., 1997</i>).....	50
TABLEAU 7 : Comparaison des diamètres ovocytaires moyens selon le stade folliculaire chez 4 espèces de mammifères (souris, hamster, truie et femme) (<i>d'après Griffin et al., 2006</i>).....	51
TABLEAU 8 : Comparaison des diamètres folliculaires et ovocytaires (ZP exclue) chez la chienne (<i>d'après Songsasen et al., 2009 et Reynaud et al., 2009</i>) et la chatte au cours de la folliculogénèse.....	53
TABLEAU 9 : Comparaison des diamètres folliculaires lors de la formation de l'antrum chez 8 espèces de mammifères (chèvre, chatte, souris, marsupiaux, femme, vache, truie, ouistiti).....	57
TABLEAU 10 : Comparaison des diamètres ovocytaires maximaux et des diamètres folliculaires pour lesquels l'ovocyte atteint sa taille maximale chez 6 espèces de mammifères (souris, hamster, chatte, chienne, femme et vache).....	61

INTRODUCTION

Longtemps, la maîtrise de la reproduction dans l'espèce féline s'est résumée à la limitation des populations. Pourtant, depuis vingt ans, les recherches sur les techniques de reproduction assistée se sont développées. D'une part, les éleveurs félins cherchent à optimiser la reproduction d'individus de haute valeur génétique. D'autre part, la sauvegarde des félidés sauvages constitue un défi pour les équipes de recherche. La famille des félidés compte 37 espèces. Toutes, hormis le chat domestique (*Felis catus*), sont considérées comme menacées d'extinction ou en voie de disparition par la Convention sur le commerce international des espèces sauvages menacées d'extinction (CITES, 1973). Or, la mise au point des techniques de reproduction assistée, telles que l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire et la fécondation *in vitro*, nécessite le contrôle, et donc la connaissance, de la formation d'un gamète femelle.

Cette cellule germinale, l'ovocyte, est entourée de cellules (cellules de la granulosa et cellules des thèques en particulier) formant un follicule ovarien. La folliculogenèse, ensemble des étapes du développement du follicule ovarien, depuis le moment où il sort du stock de follicules primordiaux, jusqu'au stade pré-ovulatoire, assure donc le développement d'un ovocyte capable d'être fécondé et de supporter le développement embryonnaire précoce à partir d'un ovocyte issu de la réserve.

La réserve folliculaire représente l'ensemble des follicules primordiaux au repos formés autour des ovogonies. Ces ovogonies sont issues des cellules germinales primordiales ayant migré dès le début de l'embryogenèse vers les crêtes génitales (Monniaux *et al.*, 1997). Les ovogonies prolifèrent dans la gonade embryonnaire par mitoses successives. Alors que chez la plupart des mammifères cette multiplication cesse peu avant la naissance, elle peut se poursuivre jusqu'à 40 jours après la naissance chez le chaton (figure 1, Mauléon, 1969). Chez la chatte, les premières ovogonies débutent la première division méiotique vers le 45^{ème} jour de développement embryonnaire (figure 1, Mauléon, 1969).



FIGURE 1 : Chronologie de la formation des ovogonies et des ovocytes chez la chatte au cours du développement embryonnaire et de la période post-natale (*d'après Mauléon, 1969*).

Chez la chatte la différenciation sexuelle (SD : *sexual differentiation*) a lieu à 30 jours (d : *days*) de développement embryonnaire. Le rectangle noir représente la durée pendant laquelle les ovogonies se multiplient par mitoses successives. La première valeur indique l'âge d'apparition des premières divisions méiotiques et le rectangle vide représente la durée pendant laquelle des ovogonies en début prophase I de méiose sont visibles. La seconde valeur (soulignée) indique l'âge à partir duquel les premiers ovocytes I bloqués au stade diplotène sont visibles.



La méiose est rapidement bloquée au stade diplotène (fin de la prophase I de méiose). L'ovogonie prend alors le nom d'ovocyte primaire (ovocyte I), et son noyau de vésicule germinative (en anglais *Germinal Vesicle* ou GV). A ce stade l'ovocyte s'entoure progressivement d'une couche de cellules aplaties appelée pré-granulosa, formant ainsi un follicule primordial. Ces cellules, futures cellules de la granulosa, semblent trouver leur origine dans le *rete ovarii* et l'épithélium ovarien (Byskov, 1975 ; Byskov *et al.*, 1977 ; Baker, 1982). La formation du follicule est probablement contrôlée par des interactions cellulaires locales. Ainsi, Upadhyay et Zamboni (1982) ont montré que les cellules germinales primordiales ayant migré par erreur dans la glande surrénale induisent les mêmes modifications morphologiques sur les cellules qui les entourent, l'ensemble prenant l'aspect d'un follicule ovarien. Réciproquement, la présence des cellules folliculaires est indispensable à la survie des ovocytes (Byskov, 1986). Ces follicules forment le stock d'ovocytes au repos ou réserve folliculaire. Tous les follicules se développeront ensuite à partir du stock ainsi constitué. Contrairement au mâle, il est admis que chez la femelle la prolifération des cellules germinales est strictement limitée à la période fœtale ou néonatale. Cependant, des études récentes semblent indiquer que leur multiplication serait possible chez l'adulte (Johnson *et al.*, 2004 ; Bukovsky *et al.*, 2004). Cette hypothèse demeure actuellement controversée. A partir du stock formé en période fœtale (ou néonatale chez la chatte), il est pour l'instant admis que le nombre de follicules ne va faire que diminuer, et ce dès la fin des mitoses.

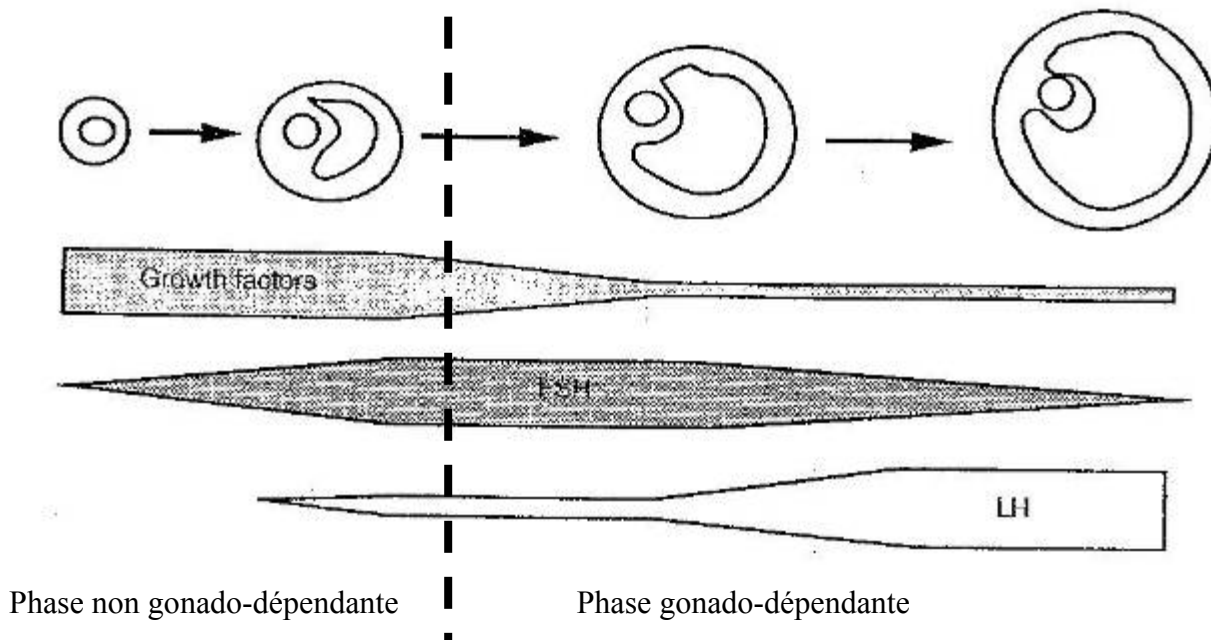
L'entrée en méiose des ovocytes et la formation des follicules primordiaux sont associées à une perte très importante de cellules germinales par apoptose. Par exemple chez la femme, cinq millions d'ovogonies et d'ovocytes sont éliminés entre le 5^{ème} mois de développement embryonnaire et la naissance, ce qui représente plus de 70 % du stock initial (Baker, 1982). L'atrésie des follicules se poursuit encore rapidement pendant la période pré-pubertaire puis, dans une moindre mesure, pendant la vie adulte. Elle concerne ensuite tous les stades folliculaires dans des proportions variables.

Le stock de follicules primordiaux diminue progressivement avec l'âge, ce qui est dû soit à leur entrée en croissance, soit à leur atrésie. Ainsi, l'ovaire de chienne âgée de 1 à 2 ans contient en moyenne 5000 à 200 000 follicules primordiaux, tandis que chez les chiennes âgées de 7 à 11 ans l'ovaire ne contient environ que 1000 à 6000 follicules primordiaux (Gosden et Telfer, 1987a). Chez la chatte, le stock maximal néonatal de follicules primordiaux est inconnu mais l'ovaire adulte contient en moyenne 74 520 follicules primordiaux (Gosden et Telfer, 1987a). Ils constituent la majeure partie de la population folliculaire.

A partir de la réserve folliculaire, l'initiation de la croissance folliculaire est un processus continu qui débute juste après la formation des follicules primordiaux (Peters, 1969). Le nombre de follicules qui quittent la réserve folliculaire est proportionnel au nombre de follicules primordiaux encore présents : en moyenne, chez le chat, seuls 2 % du nombre total de follicules ovariens observés à un instant donné ont initié leur croissance (Jewgenow et Paris, 2006). On distingue deux phases dans le déroulement de la croissance folliculaire : la phase non gonado-dépendante et la phase gonado-dépendante (figure 2, Monniaux *et al.*, 1997).

La première phase est appelée croissance folliculaire basale. Elle représente environ 85 % de la durée totale de la folliculogenèse chez la souris et la lapine, du follicule primordial jusqu'à la formation de l'antrum (Monniaux *et al.*, 1997). Cette phase est classiquement qualifiée de non gonado-dépendante. En effet, chez les rattes hypophysectomisées, les follicules sont capables de se développer jusqu'au stade antral (Driancourt *et al.*, 2001). De plus, cette phase est indépendante du cycle sexuel. La croissance folliculaire basale est donc majoritairement contrôlée par des régulations cellulaires locales, mais les mécanismes précis demeurent mal élucidés et semblent varier d'une espèce à l'autre (Monniaux *et al.*, 1997 ; Fortune, 2003).

FIGURE 2 : Représentation schématique de l'importance relative des différents facteurs au cours du développement folliculaire (d'après Monniaux *et al.*, 1997).



Il est désormais admis que les gonadotropines (notamment la *Follicle Stimulating Hormone* ou FSH) jouent néanmoins un rôle dans cette première phase de croissance folliculaire. Chez les rongeurs, les cellules de la granulosa des petits follicules pré-antraux se multiplient plus rapidement en réponse aux changements de concentration sanguine en hormones gonadotropes lors du pro-œstrus et de l'œstrus, ou lors de l'administration de FSH. Leur action est probablement indirecte, médiée par d'autres messagers, ce qui expliquerait les différences observées entre les études menées *in vivo* et *in vitro* (Monniaux *et al.*, 1997).

Durant la croissance basale du follicule à partir du follicule primordial, les cellules de la granulosa se multiplient de façon intense et forment progressivement une couche de cellules cuboïdales autour de l'ovocyte (follicule primaire), puis deux couches (follicule secondaire), et enfin plus de deux couches cellulaires entourant l'ovocyte (follicule pré-antral). La zone pellucide (ZP), composée de glycoprotéines et traversée d'expansions cellulaires, se forme. L'ovocyte et les cellules de la granulosa sont en contact étroit *via* des jonctions adhérentes et des jonctions gap qui permettent des échanges privilégiés (Driancourt *et al.*, 2001). Les futures cellules formant les thèques sont recrutées parmi les cellules du stroma ovarien (Fortune, 2003 ; Bristol-Gould et Woodruff, 2006). Elles sont séparées de la granulosa par une membrane basale. La thèque interne contient des cellules stéroïdogènes et des capillaires

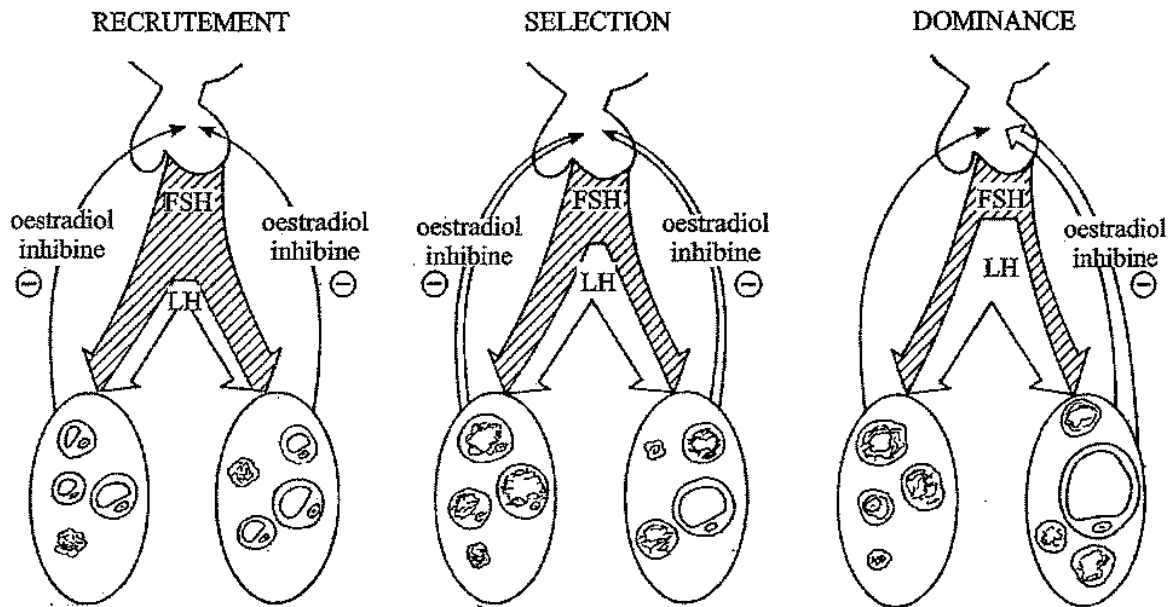
sanguins ; la thèque externe est composée de cellules stéroïdogènes en nombre moindre, de capillaires sanguins, de fibroblastes, de cellules musculaires lisses et de cellules nerveuses (Monniaux *et al.*, 1997). La formation de l'antrum marque la fin de la croissance folliculaire basale. Il se forme par la fusion de petites cavités créées entre les cellules de la granulosa.

La croissance folliculaire devient ensuite strictement gonado-dépendante. On parle de croissance folliculaire terminale. Selon les espèces, il existe un stade à partir duquel le follicule requiert un apport minimal en FSH pour poursuivre sa croissance. Le plus souvent, cette étape a lieu autour de la formation de l'antrum (formation de l'antrum chez la souris, stade jeune antral chez la plupart des autres mammifères étudiés, Monniaux *et al.*, 1997). Il s'agit d'une croissance cyclique qui se déroule par vagues (Evans, 2003). Chez les mammifères, une à six vagues folliculaires se produit au cours d'un seul cycle ovarien selon l'espèce concernée, mais leur déroulement n'est pas strictement associé à la cyclicité (Monniaux *et al.*, 1997). En effet, des vagues folliculaires ont été observées chez des femelles pré-pubères ou gestantes, mais les follicules n'atteignent alors pas le diamètre maximal des follicules observés en période de reproduction (Evans, 2003). Chez la chatte, un cycle sexuel comporte une seule vague folliculaire (Malandain *et al.*, 2006).

La croissance folliculaire terminale débute par le recrutement des follicules qui ont acquis la capacité de répondre à une stimulation directe de la FSH, ce qui aboutit au développement d'une cohorte (Monniaux *et al.*, 1997). Seule une partie de ces follicules est ensuite sélectionnée pour poursuivre leur croissance. Leur nombre est caractéristique de l'espèce concernée et ils représentent l'ensemble des follicules destinés à ovuler au cours du cycle. En effet, lorsque la concentration plasmatique en FSH diminue, seuls les follicules ayant des besoins réduits en FSH sont capables de se développer. Ils ont acquis cette capacité par l'augmentation de leur vascularisation, l'acquisition de récepteurs à la LH (ou *Luteinizing Hormone*), et surtout par l'amplification de la réponse folliculaire à la LH et à la FSH. Dès lors qu'il est sélectionné, le follicule exerce une dominance sur les autres : il inhibe le recrutement et la sélection des follicules qui n'ont pas été sélectionnés au cours de cette vague (Gougeon, 1996). La figure 3 illustre de façon schématique les mécanismes hormonaux à l'origine du recrutement, de la sélection et de la dominance.

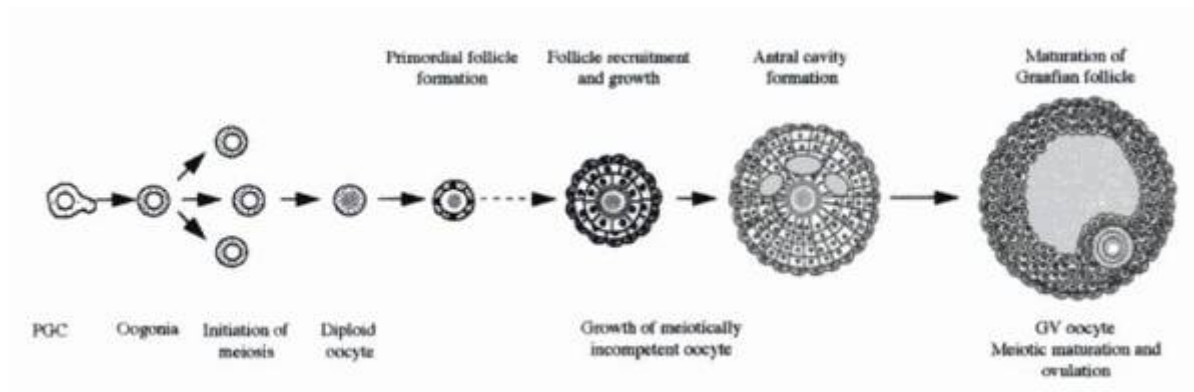
FIGURE 3 : Sécrétion de gonadotropines et facteurs de rétrocontrôle au cours des phases de recrutement, sélection et dominance (d'après Driancourt *et al.*, 2001).

L'épaisseur des flèches indique l'importance de chaque sécrétion. Les follicules atrétiques ont perdu leur structure caractéristique.



Après la formation de l'antrum, la croissance du follicule se fait surtout par l'augmentation de taille de la cavité antrale ; les cellules de la granulosa, dont la multiplication était maximale juste avant la formation de l'antrum, prolifèrent de moins en moins rapidement (Monniaux *et al.*, 1997). L'ovocyte se trouve ainsi progressivement repoussé au bord de la cavité antrale. Il est entouré d'une à deux couches de granulosa qui forment la *corona radiata* et il est relié à la paroi du follicule par le *cumulus oophorus*. La figure 4 résume les étapes clés des transformations morphologiques du follicule ovarien au cours du développement folliculaire.

FIGURE 4 : Représentation schématique de l'évolution morphologique du follicule ovarien au cours de la folliculogénèse (d'après Picton et Gosden, 1999).

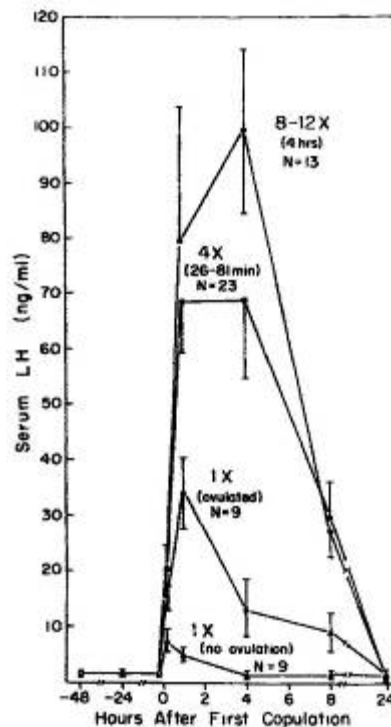


L'augmentation de taille du follicule est corrélée à un accroissement de la synthèse d'œstradiol par les cellules de la granulosa. L'augmentation de la concentration plasmatique en œstradiol coïncide avec l'apparition des chaleurs qui durent de 5 à 7 jours chez la chatte (Shille *et al.*, 1979 ; Malandain *et al.*, 2006). Les œstrogènes induisent également la production de LH par le biais de rétrocontrôles. La chatte est une espèce à ovulation provoquée. En l'absence de coït, les concentrations de LH n'atteignent pas le seuil nécessaire pour déclencher l'ovulation. La stimulation mécanique générée par le coït provoque une augmentation de l'activité pulsatile de l'hypothalamus *via* le GnRH (ou *Gonadotropin Releasing Hormone*) et un pic de LH est induit (Goodrowe *et al.*, 1989). L'amplitude et la durée du pic de LH dépendent du nombre d'accouplements (figure 5, Concannon *et al.*, 1980).

La LH permet la croissance finale du follicule et la maturation de l'ovocyte. Son action est médiée par des récepteurs spécifiques situés dans la thèque interne des jeunes follicules antraux (supérieurs à 300 µm de diamètre) et dans la granulosa des grands follicules antraux (supérieurs à 800 µm de diamètre) (Saint-Dizier *et al.*, 2007). Au sein de l'ovocyte, l'enveloppe nucléaire disparaît progressivement. On parle de rupture de la vésicule germinative (*Germinal Vesicle BreakDown* ou GVBD). L'ovocyte reprend ensuite la première division de méiose, qui s'accompagne de l'émission du premier globule polaire, puis il initie la deuxième division méiotique (Mermillod, 2001). L'ovocyte est alors à nouveau bloqué en

métaphase II. Il prend le nom d'ovocyte secondaire (ovocyte II). La résolution complète de la méiose aura lieu lors de la fécondation.

FIGURE 5 : Concentration sérique en LH en fonction du nombre de copulations chez la chatte (d'après Concannon *et al.*, 1980).



L'ovulation a lieu, chez la chatte, 25 à 32 heures après le coït, soit 23 à 30 heures après le pic de LH (Shille *et al.*, 1983). Elle s'apparente à une réaction inflammatoire, avec un œdème de la granulosa, une dissociation du collagène de la paroi du follicule et de l'ovaire, une dissociation des cellules de la granulosa, une fragilisation de la paroi de l'apex du follicule en relation avec une ischémie locale et une augmentation de la pression intra-folliculaire (Espey, 1994). L'ovulation aboutit à l'expulsion dans les voies génitales de l'ovocyte II entouré de la corona radiata. En moyenne, 5 ovocytes mesurant 3 à 4 mm sont libérés lors de l'ovulation chez la chatte (Wildt *et al.*, 1981 ; Malandain *et al.*, 2006).

Le déroulement d'un cycle ovarien complet aboutissant à l'ovulation n'est possible que chez les animaux pubères. Chez la chatte, la puberté intervient entre 4 mois et plus d'un an. Cette variabilité dépend de la race (elle est plus précoce chez les races à poils courts telles que les Siamois que chez les races à poils longs telles que les Persans), du poids (elle survient lorsque l'animal a atteint au moins 80 % de son poids adulte) et de la saison (Noël, 2003). Ce dernier facteur est un élément majeur influençant la date d'apparition des premières chaleurs. En effet la chatte est une espèce saisonnée : la reproduction a lieu en période de jours croissants (des mois de janvier-février à août-septembre dans l'hémisphère Nord ; Chaffaux et Bazile, 2001). Ainsi, si une chatte atteint l'âge de la puberté pendant la période d'œstrus physiologique saisonnier, elle n'entrera en chaleurs qu'au mois de janvier ou de février suivant. En période de reproduction, le cycle sexuel de la chatte dure de 14 à 21 jours (Wildt *et al.*, 1981).

Après l'expulsion de l'ovocyte lors de l'ovulation, la rupture des capillaires sanguins entraîne l'accumulation de sang dans la cavité antrale puis d'un caillot sanguin. L'ensemble de ces transformations aboutit à la formation d'un corps hémorragique. Les cellules de la granulosa prolifèrent et comblent peu à peu la cavité antrale. Les capillaires provenant de la thèque interne se développent. C'est la formation du corps jaune, capable de synthétiser la progestérone (Baker, 1982).

En l'absence d'accouplement, et donc de pic de LH, le ou les follicules sélectionnés régressent. En moyenne, 65 % des follicules pré-antraux et antraux en croissance sont voués à l'atrésie (Wood *et al.*, 1997). Au total, plus 99 % des follicules formés ne parviendront pas jusqu'à l'ovulation.

Sur la base des mécanismes de régulation de cette folliculogénèse, largement décrits chez la chatte (Shille *et al.*, 1979 ; Concannon *et al.*, 1980 ; Wildt *et al.*, 1981 ; Goodrowe *et al.*, 1989), et des connaissances acquises dans d'autres espèces, certaines techniques de reproduction assistée ont été mises au point ou initiées chez la chatte. L'une des difficultés des études portant sur la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire précoce chez le chat est que les ovocytes et les embryons sont noirs et opaques, du fait d'une accumulation intracytoplasmique de lipides. Ceci rend difficile l'évaluation du stade nucléaire atteint par les ovocytes et du taux de formation des deux *pronuclei*. Il est toutefois possible de centrifuger ces cellules afin de modifier leur répartition lipidique (Goodrowe *et al.*, 1988).

La maîtrise de la reproduction concerne en premier lieu la production d'ovocytes. Chez la chatte, l'induction de l'œstrus et de l'ovulation sont des techniques aujourd'hui maîtrisées (Goodrowe *et al.*, 1989). L'obtention d'un large nombre d'ovocyte par superovulation n'est désormais plus limitée à la saison de reproduction (Tsutsui *et al.*, 2000). La réalisation de la folliculogénèse *in vitro*, quant à elle, demeure incomplètement réalisée. Explorée depuis 1989 par Johnston *et al.* (Comizzoli *et al.*, 2003), la culture de follicules félines *in vitro* n'est disponible que pour quelques stades folliculaires et sur une durée limitée. Ainsi, Jewgenow et Goritz (1995) sont parvenus à cultiver des follicules félines primordiaux et primaires dès 1993 mais la transformation des follicules primordiaux en follicules primaires n'a jamais été obtenue *in vitro* (Jewgenow et Paris, 2006). Par contre, Jewgenow (1993) a mis au point des conditions de culture autorisant les follicules pré-antraux à développer une cavité antrale. L'essor des xéno greffes permet aujourd'hui la survie et le développement de follicules ovariens chez un individu d'espèce différente. Cette technique constitue un enjeu majeur de la sauvegarde des espèces en voie de disparition. Chez la chatte, elle a d'abord été décrite par Gosden *et al.* (1994). Dans cette étude, des fragments de cortex ovariens ont été greffés dans la capsule rénale de souris immunodéficientes. Le greffon était ensuite examinée *post-mortem*, par euthanasie du receveur 1 à 9 mois après la greffe. Fassbender *et al.* (2007) ont été les premiers à décrire précisément le développement des follicules félines greffés *in vivo*, grâce à l'utilisation de l'échographie. Dans ces études, les follicules étaient capables de se développer jusqu'à un diamètre proche de l'ovulation (3,3 mm). De plus, Fassbender *et al.* (2007) ont montré que les ovocytes obtenus par ponction de ces follicules étaient capables de reprendre leur division méiotique *in vitro*. Plus récemment, la maturation *in vitro* (MIV) a été fréquemment utilisée pour les ovocytes issus de grands follicules antraux lors d'études portant sur la fécondation *in vitro* (FIV). Chez la chatte, la MIV a été réalisée avec succès pour la première fois par Johnston *et al.* en 1989. Son efficacité a été évaluée par l'observation de la maturation nucléaire, et l'obtention d'embryons après FIV. Dans des conditions optimales de culture, 59 à 80 % des ovocytes de bonne qualité récoltés sont capables d'achever leur maturation nucléaire, et 45 à 50 % forment des blastocystes (Comizzoli *et al.*, 2003). Cette technique est néanmoins beaucoup plus efficace lorsque les ovocytes sont collectés pendant la saison de reproduction. En effet, Spindler et Wildt (1999) ont montré que seuls 20 % des ovocytes récoltés dans les mêmes conditions hors de la période de reproduction étaient capables d'achever leur maturation nucléaire, et aucun ne permettait le développement d'un embryon après FIV.

Outre la production d'ovocytes, les techniques de reproduction assistée se sont attachées à la production d'embryons. L'insémination artificielle (IA) a été étudiée depuis 1970 par Sojka *et al.* Les spermatozoïdes sont le plus souvent récoltés par dissection épидидymaire, cathétérisation urétrale ou électro-éjaculation. Actuellement, les taux de gestation obtenus après IA intra-vaginale et intra-utérine sont respectivement de 50-78 % et 50-80 % après insémination en semence fraîche, et 0-10 % et 57 % après insémination en semence congelée (Tsutsui, 2006). Les premières naissances obtenues par transfert embryonnaire (TE) ont été décrites dans l'espèce féline par Kraemer *et al.* en 1979 (Goodrowe *et al.*, 1989). Les jeunes embryons âgés de 6 à 9 jours étaient alors transférés après fécondation *in vivo* et un développement précoce chez la mère. Le développement de cette technique a permis les progrès de la FIV et des techniques de maturation ovocytaire *in vitro* (Pope *et al.*, 1993 et 1997). Les premiers embryons félines issus de la FIV ont été obtenus par Hamnet *et al.* en 1970. Ils ont utilisé des ovocytes fraîchement ovulés collectés dans l'oviducte après stimulation ovarienne, et des spermatozoïdes qui avaient préalablement réalisé leur capacitation *in utero* récoltés par hystérectomie après l'accouplement (Goodrowe *et al.*, 1989). Selon les techniques utilisées (notamment l'origine et le mode de conservation des ovocytes et des spermatozoïdes), les résultats de la FIV sont variables. Par exemple, après FIV, jusqu'à 80 % des ovocytes fécondés se sont développés jusqu'au stade blastocyste après maturation ovocytaire *in vivo*, alors que, après maturation *in vitro*, les études qui ont obtenu les meilleurs résultats ne rapportent que 46 % de blastocystes (Pope *et al.*, 2006). Ces dernières années, la fécondation par injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde (*Intra-Cytoplasmic Sperm Injection* ou ICSI) a été réalisée avec succès chez le chat : après MIV et TE, 3 des 18 chattes (17 %) transplantées par Gomez *et al.* (2000) ont été gestantes et ont donné naissance à des chatons viables. Enfin, depuis le début du XXIème siècle, le clonage est possible dans l'espèce féline (Shin *et al.*, 2002). Depuis, des naissances de chatons issus d'une deuxième génération de clonage ont été obtenues (Yin *et al.*, 2008a). De même, la transgénèse se développe progressivement. Elle a été rendue possible par le séquençage complet du génome félin, qui a été réalisé chez un chat de race Abyssin par Pontius *et al.* en 2007. Yin *et al.* (2008b) ont été les premiers produire des chatons obtenus par transgénèse qui exprimaient la protéine RFP, une protéine fluorescente, dans leurs fibroblastes.

Les techniques de reproduction assistée ont donc connu un développement considérable chez le chat et les félinés sauvages. Pourtant, la dynamique de la croissance folliculaire et ovocytaire a fait l'objet de très peu d'études dans cette espèce. Le diamètre du



follicules pré-ovulatoire (3-5 mm) a d'abord été déterminé par laparoscopie et laparotomie (Wildt *et al.*, 1981 ; Goodrowe *et al.*, 1989). Plus récemment, la croissance folliculaire terminale (de 1 mm de diamètre jusqu'à l'ovulation) a été suivie par échographie (Gunzel-Apel *et al.*, 1998 ; Malandain *et al.*, 2006). Mais les études concernant l'évaluation du diamètre folliculaire, des stades folliculaires et du diamètre ovocytaire (Gosden et Telfer, 1987 ; Barber *et al.*, 2001 ; Bristol-Gould et Woodruff, 2006) demeurent incomplètes. Le but de cette étude était donc de réaliser une analyse histologique et morphométrique complète de la croissance folliculaire chez le chat, du stade primordial à pré-ovulatoire. Les critères suivis ont été le diamètre du follicule, le stade folliculaire, le diamètre de l'ovocyte et l'épaisseur de la zone pellucide. Ces observations ont pour objectif de déterminer les principales étapes de la folliculogenèse chez la chatte.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1.RECOLTE ET SELECTION DES OVAIRES

Les ovaires ont été collectés lors d'ovariectomies de convenance de 43 chattes dans le cadre des activités cliniques de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Ces chattes étaient âgées de 7 mois à 3 ans et 4 mois (moyenne \pm erreur standard sur la moyenne : $1,17 \pm 0,09$ ans) et au moins cinq d'entre elles présentaient des signes comportementaux d'œstrus. Il n'a pas été tenu compte de leur race, mais il s'agissait, pour la plupart, de chattes de type européen.

Dès leur exérèse, les ovaires ont été placés dans une solution contenant un tampon phosphate (*Phosphate Buffered Saline* ou PBS, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et maintenus à 38°C, c'est-à-dire dans des conditions d'osmolarité et de température proches de celles retrouvées *in vivo*. La figure 6 présente l'aspect macroscopique d'un ovaire de chatte présentant de nombreux grands follicules immédiatement après son exérèse.

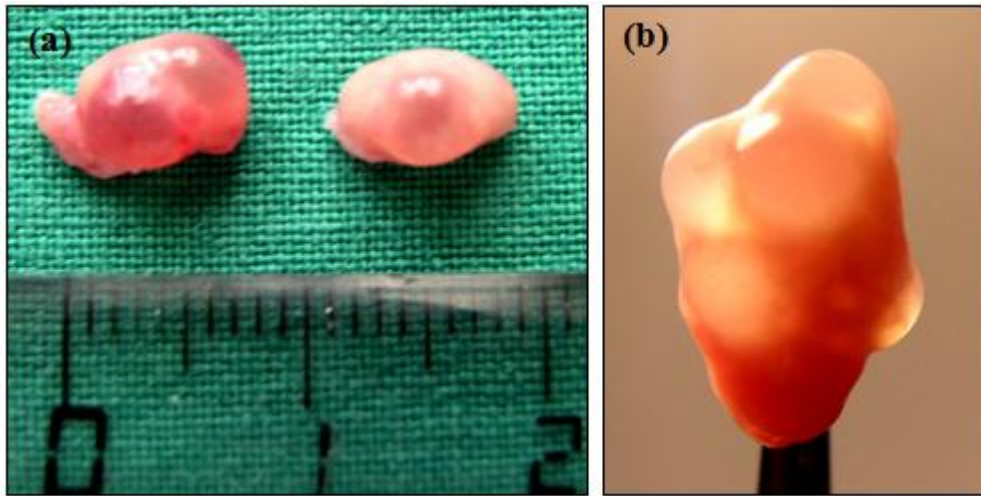
1.2.PREPARATION HISTOLOGIQUE

Seuls les ovaires présentant de nombreux follicules de 1 à 3,5 mm de diamètre et sur lesquels aucun corps jaune ne pouvait être observé ont été sélectionnés et fixés dans une solution de formaldéhyde à 10 % (v/v, VWR, Fontenay sous Bois, France) pendant une semaine.

Suite à leur fixation, les ovaires ont été progressivement déshydratés par passages successifs dans des solutions d'éthanol (VWR) de degré croissant. Ils ont ensuite été inclus dans la paraffine (Paraplast, CML, Nemours, France) et disposés dans des moules plastiques cubiques.

FIGURE 6 : Ovaires de chatte après exérèse.

Les ovaires mesurent environ 1 cm x 0,5 cm (a). Ils présentent de nombreux follicules de diamètre supérieur à 1 mm visibles macroscopiquement, particulièrement par transillumination (b).



Le détail du protocole de déshydratation et d'inclusion des ovaires est donné dans l'annexe 1.

Après démoulage, les blocs de paraffine ont été sectionnés à l'aide d'un microtome (Leitz, Wetzlar, Allemagne), en coupes de 7 μm d'épaisseur. Les lames ont préalablement été traitées au 3-aminopropyltriéthoxysilane (silane, Sigma-Aldrich), un composé corrosif, afin que les coupes de paraffine adhèrent plus efficacement.

Les coupes ont ensuite été déposées sur les lames traitées et placées sur une plaque chauffante à 42°C afin de permettre leur étirement. L'excédent de milieu de montage a été éliminé grâce à un papier absorbant et les lames ont été laissées à température ambiante pendant douze heures sur un portoir pour le séchage.

Les lames ainsi préparées ont été réhydratées dans des bains successifs de solutions d'éthanol de degré décroissant et colorées par la coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) (annexe 2). L'hématoxyline colore d'abord les noyaux cellulaires en violet. L'éosine colore ensuite le cytoplasme des cellules en rose. Enfin, le safran colore les fibres de collagène du tissu conjonctif en orange.

Les lames ont enfin été montées avec des lamelles à l'aide du milieu Eukitt (CML).

1.3.MESURE DES DIAMETRES FOLLICULAIRES ET OVOCYTAIRES

Chaque coupe d'ovaire a été observée au microscope (BX41, Olympus, Rungis, France). Les mesures ont été réalisées grâce à un micromètre oculaire.

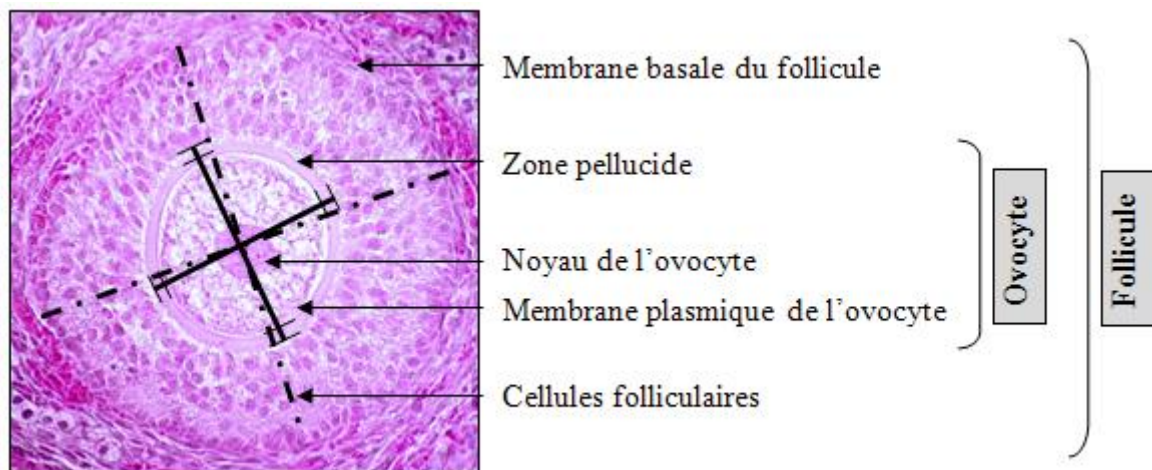
Le diamètre des follicules et des ovocytes a été déterminé par deux mesures perpendiculaires en prenant comme limites :

- pour le follicule, la membrane basale
- pour l'ovocyte, la zone pellucide d'une part, et la membrane cytoplasmique d'autre part.

La différence entre les deux types de mesures réalisées pour le diamètre ovocytaire a permis de calculer l'épaisseur de la zone pellucide. Sauf mention contraire, nous nommerons désormais « diamètre ovocytaire » le diamètre mesuré en incluant la zone pellucide. La figure 7 présente la photographie d'un follicule pré-antral au microscope optique sur laquelle sont annotés les repères qui ont été choisis pour mesurer les diamètres ovocytaires et folliculaires.

FIGURE 7 : Repères de mesure des diamètres ovocytaire et folliculaire.

La photographie présente un follicule pré-antral de chatte au microscope optique (x100). Les diamètres de l'ovocyte (trait plein) incluant ou non la zone pellucide et du follicule (pointillés) sont représentés tels qu'ils ont été mesurés.



Chaque mesure a été réalisée au grossissement le plus élevé possible, c'est-à-dire x400 pour les follicules inférieurs à 300 μm , x200 ou x100 pour les follicules de 300 à 1000 μm et x40 pour les follicules de plus de 1000 μm . Les lames ont été photographiées à l'aide d'un appareil photographique numérique (Camedia digital camera C-3030 zoom, Olympus, Rungis, France). Les images ainsi obtenues ont été transférées vers un ordinateur *via* un logiciel spécifique (Camedia Master 2.0, Olympus) puis analysées. Cette procédure a permis de localiser plus aisément les lames d'intérêt, et donc d'effectuer un gain de temps considérable. Les plus gros follicules ont été observés sur plusieurs coupes consécutives afin de déterminer avec précision leur diamètre maximal. Pour ces follicules, le diamètre de l'ovocyte a été mesuré sur la coupe centrée sur son noyau. La présence de plusieurs ovocytes par follicule, caractérisant un follicule polyovocyttaire, n'a pas été spécifiquement étudiée. Les résultats ont été retranscrits dans des tableaux dont un exemple est donné en annexe 4. Pour chaque follicule ont été rapportés le stade folliculaire, le diamètre de l'ovocyte comprenant ou non la zone pellucide et le diamètre du follicule. Pour chaque donnée, le numéro de la lame ayant été utilisée pour la mesure ainsi que le grossissement choisi ont été soigneusement indiqués afin de permettre les vérifications éventuelles.

1.4. CLASSIFICATION DES STADES FOLLICULAIRES

Pedersen et Peters (1968) ont proposé une classification des ovocytes et des follicules à partir de leurs observations chez la souris. Elle est basée sur la taille de l'ovocyte, la taille du follicule, le nombre de cellules folliculaires entourant l'ovocyte (nombre de cellules visibles au microscope optique sur la plus grande section du follicule) et la présence et la morphologie de l'antrum. Cette classification a été reprise dans cette étude. Néanmoins, dans un souci de simplification, certains stades folliculaires ont été regroupés (tableau 1).

Nous avons ainsi défini les stades folliculaires comme suit (figure 8) :

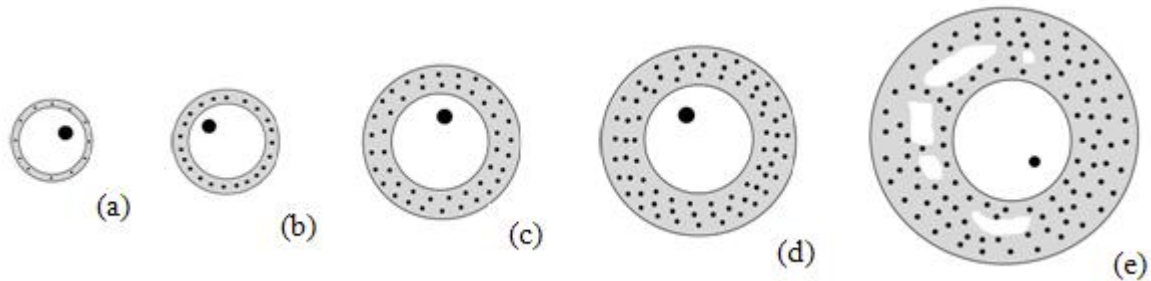
- Primordial : ovocyte entouré de couche de cellules folliculaires aplaties
- Primaire : ovocyte entouré d'une couche de cellules folliculaires cuboïdales
- Secondaire : ovocyte entouré de deux couches de cellules folliculaires
- Pré-antral : ovocyte entouré de plus de deux couches de cellules folliculaires
- Jeune antral : follicule contenant plusieurs petites cavités antrales
- Antral : follicule contenant une grande cavité antrale unique

TABLEAU 1 : Correspondance entre la classification folliculaire utilisée dans notre protocole et la classification proposée par Pedersen et Peters (1968).

Classification utilisée	Classification de Pederson et Peters
	<u>Type 1</u> : ovocyte de taille réduite dépourvu de cellules folliculaires à sa surface
Primordial	<u>Type 2</u> : ovocyte de taille réduite entouré de quelques cellules folliculaires qui ne forment pas un anneau complet
	<u>Type 3a</u> : Ovocyte de taille réduite ou moyenne entouré d'un anneau complet de cellules folliculaires (< 20 cellules folliculaires sur la coupe la plus large)
Primaire	<u>Type 3b</u> : Ovocyte de taille moyenne entouré d'un anneau complet de cellules folliculaires (21-61 cellules folliculaires sur la coupe la plus large)
Secondaire	<u>Type 4</u> : Ovocyte de taille moyenne entouré de 2 couches de cellules folliculaires (61-100 cellules folliculaires sur la coupe la plus large)
Pré-antral	<u>Type 5a</u> : Ovocyte de taille moyenne ou grande entouré de 3 couches de cellules folliculaires (101-200 cellules folliculaires sur la coupe la plus large)
	<u>Type 5b</u> : Ovocyte de grande taille entouré de plus de 3 couches de cellules folliculaires (201-400 cellules folliculaires sur la coupe la plus large)
Jeune antral	<u>Type 6</u> : Ovocyte de grande taille entouré de plusieurs couches de cellules folliculaires creusées de plusieurs petites cavités antrales (401-600 cellules folliculaires sur la coupe la plus large)
Antral	<u>Type 7</u> : Follicule de grande taille creusé d'une cavité antrale unique (> 600 cellules folliculaires sur la coupe la plus large). Le <i>cumulus oophorus</i> est formé.
	<u>Type 8</u> : Follicule de grande taille creusé d'une large cavité antrale unique. Le <i>cumulus oophorus</i> et le pédicule qui le soutient sont bien formés.

FIGURE 8 : Représentation schématique de la classification des stades folliculaires utilisée.

(a) : follicule primordial ; (b) : follicule primaire ; (c) : follicule secondaire ; (d) : follicule pré-antral ; (e) : jeune follicule antral



1.5. ANALYSE STATISTIQUE

Pour chaque stade folliculaire, les moyennes des diamètres folliculaires, ovocytaires ainsi que l'épaisseur de la zone pellucide ont été calculées et les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne \pm SEM (en anglais *Standard Error of the Mean*, ou erreur-type sur la moyenne).

L'erreur-type est le résultat du quotient de l'écart type de l'échantillon par la racine carrée de la taille de cet échantillon. Elle informe sur le degré selon lequel la moyenne de l'échantillon approche la moyenne de la population. Plus elle est petite, plus l'échantillon est donc représentatif. De même, plus l'échantillon est grand, plus cette erreur est petite.

Lors de la comparaison des diamètres folliculaires, des diamètres ovocytaires et de l'épaisseur de la zone pellucide en fonction du stade folliculaire, nous avons procédé à une analyse de la variance puis à un test de Student-Neuman-Keuls (SAS, Cary, NC, USA).

L'analyse de la variance (ANOVA, en anglais *ANalysis Of VAriance*), est un test statistique qui permet de comparer les moyennes issues de plusieurs échantillons. On peut considérer qu'il s'agit d'une généralisation du test de Student à plus de deux moyennes. En effet, l'utilisation du test de Student pour comparer les moyennes deux par deux conduirait à surestimer le risque d'erreur. Nous avons supposé pour l'utilisation de ces tests que la distribution des populations observées suivait une loi normale dont les variances étaient identiques. De plus, nous avons décidé de façon arbitraire que les résultats seraient

significatifs si le risque de considérer que les moyennes observées étaient différentes alors qu'elles ne l'étaient pas (risque α) était inférieur à 5 %.

La conclusion de l'ANOVA utilisée seule est que toutes les moyennes comparées sont identiques ou que l'une des moyennes est significativement différente. Nous avons donc poursuivi notre étude par un test de Student-Neuman-Keuls qui a permis de comparer les moyennes deux par deux.

Enfin, afin de permettre la mise en relation de la croissance folliculaire avec la croissance ovocytaire, nous avons utilisé les régressions linéaires simples fournies par le logiciel Excel (Office XP, Microsoft, Courtaboeuf, France). Pour chaque équation nous avons calculé le coefficient r , appelé coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson.

Ce coefficient a pour but d'évaluer la pertinence de la régression linéaire. Il peut être comparé à une valeur seuil indiquée dans la table de Bravais-Pearson, et qui tient compte de la taille de l'échantillon étudié ainsi que du risque d'erreur toléré. En règle générale on considère que le test est valide lorsque r est supérieur à la moitié de la racine de 3 (environ 0,87). Par convention, nous avons choisi d'indiquer le carré de ce coefficient, r^2 , qui représente le coefficient de détermination et permet de faciliter la comparaison. La valeur de ce dernier est comprise entre 0 et 1, 1 indiquant une corrélation parfaite. Ainsi, $r^2 = 0,8$ signifie que 80 % de la variation de Y est expliquée par la variation de X et *vice versa*.

On en déduit la probabilité qu'il n'y ait pas réellement de relation linéaire (risque α) entre les deux variables, notée P . Par convention, nous avons choisi de rejeter cette hypothèse lorsque cette probabilité était inférieure à 5 %.

2. RESULTATS

Tous les follicules mesurant plus de 1 mm de diamètre ont été mesurés. En moyenne, $19,6 \pm 2,7$ follicules ont été mesurés par chatte. Au total, 832 follicules appartenant à 43 chattes différentes ont été mesurés et inclus dans l'étude. Ces ovaires comprenaient des follicules dont les diamètres étaient compris entre $33,8 \mu\text{m}$ et $3600 \mu\text{m}$. Le détail des ovaires utilisés est présenté en annexe 5.

2.1. CROISSANCE FOLLICULAIRE

L'étude a porté sur 257 follicules du stade primordial à jeune antral. Le tableau 2 présente les diamètres moyens mesurés pour chaque stade folliculaire, ainsi que leur erreur standard et le diamètre minimal et maximal observé dans chaque catégorie. D'un stade folliculaire au suivant, les diamètres folliculaires moyens augmentent significativement ($P < 0,0001$). Le plus petit follicule primordial observé mesurait $33,8 \mu\text{m}$, et le plus grand follicule antral $340 \mu\text{m}$.

Dans cette étude, le diamètre des follicules primordiaux, qui constituent les plus petits follicules et sont constitués d'un ovocyte entouré d'une couche de cellules folliculaires aplaties (figure 9), était approximativement de $45 \mu\text{m}$. Lorsque les cellules folliculaires prolifèrent pour former une couche de cellules cuboïdales (follicules primaires, figure 10), ce diamètre double (approximativement $90 \mu\text{m}$). Les follicules secondaires (figure 11), pré-antraux (figure 12) et jeunes antraux (figure 13) mesuraient respectivement $126,0 \mu\text{m}$, $155,6 \mu\text{m}$ et $223,8 \mu\text{m}$ en moyenne. Le plus grand follicule pré-antral observé mesurait $206 \mu\text{m}$ de diamètre et le plus petit follicule contenant une cavité antrale mesurait $164 \mu\text{m}$. Entre ces deux valeurs, nous avons observé à la fois des follicules pré-antraux et antraux.

TABLEAU 2 : Diamètre folliculaire des premiers stades folliculaires.

Pour chaque stade folliculaire, les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs entre parenthèses indiquent les diamètres minimum et maximum mesurés.

Les valeurs dont l'exposant (lettres a-e) est différent sont significativement différentes ($P < 0,0001$).

Stade folliculaire	n	Diamètre folliculaire (μm)
Primordial	52	$44,3 \pm 0,85^a$ (33,8-65,5)
Primaire	53	$86,2 \pm 1,8^b$ (58,8-110,0)
Secondaire	50	$126,0 \pm 2,2^c$ (86,3-158,8)
Pré-antral	50	$155,6 \pm 2,9^d$ (117,5-206,3)
Jeune antral	52	$223,8 \pm 5,3^e$ (163,8-340,0)

2.2.CROISSANCE OVOCYTAIRE

Le diamètre de l'ovocyte contenu dans les 257 follicules observés précédemment a également été déterminé. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 3. De même qu'il a été constaté pour le diamètre folliculaire, d'un stade folliculaire au suivant, les diamètres ovocytaires moyens augmentent significativement. Le plus petit ovocyte observé mesurait 30 μm mais le diamètre ovocytair moyen d'un follicule primordial était d'environ 40 μm . L'ovocyte croît ensuite progressivement jusqu'à atteindre plus de 100 μm pour les jeunes follicules antraux.

Des follicules polyovocytaires ont été observés (figure 14) mais ni leur fréquence ni leur diamètre n'ont été spécifiquement étudiés.

TABLEAU 3 : Diamètre ovocytaire des premiers stades folliculaires.

Pour chaque stade folliculaire, les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs entre parenthèses indiquent les diamètres minimum et maximum mesurés. Les diamètres ovocytaires sont indiqués incluant la zone pellucide.

Les valeurs dont l'exposant (lettres a-e) est différent sont significativement différentes ($P < 0,0001$).

Stade folliculaire	n	Diamètre ovocytaire (μm)
Primordial	52	$40,5 \pm 0,8^a$ (30,0-56,3)
Primaire	53	$63,8 \pm 1,4^b$ (43,8-82,5)
Secondaire	50	$86,2 \pm 1,8^c$ (58,8-107,5)
Pré-antral	50	$97,3 \pm 1,8^d$ (67,5-120,0)
Jeune antral	52	$108,1 \pm 1,6^e$ (81,3-125,3)

2.3.RELATION ENTRE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE ET OVOCYTAIRE

2.3.1. SELON LE STADE FOLLICULAIRE

Le follicule et l'ovocyte ne suivent pas une croissance parallèle tout au long du développement folliculaire.

La figure 15 met en relation les diamètres folliculaires et ovocytaires. Chaque stade folliculaire est représenté par un symbole différent afin d'apprécier leur croissance respective.

Jusqu'à la formation de l'antrum (follicules primordiaux, primaires, secondaires et pré-antraux), le diamètre de l'ovocyte augmentait de façon proportionnelle au diamètre folliculaire. Cette croissance est bien décrite par un modèle linéaire selon la formule suivante :

$$y = 0,526x + 17,68$$

avec x le diamètre folliculaire et y le diamètre ovocytaire. Le coefficient de détermination r^2 était de 0,92 ($P < 0,0001$).

FIGURE 9 : Follicules primordiaux de chatte en microscopie optique.

Les follicules primordiaux sont souvent groupés en périphérie de l'ovaire (figures a-d). Ils sont constitués d'un ovocyte entouré d'une couche de cellules folliculaires aplaties (flèche, figures e-f). A ce stade, la zone pellucide n'est pas visible.

La barre d'échelle représente 25 μ m.

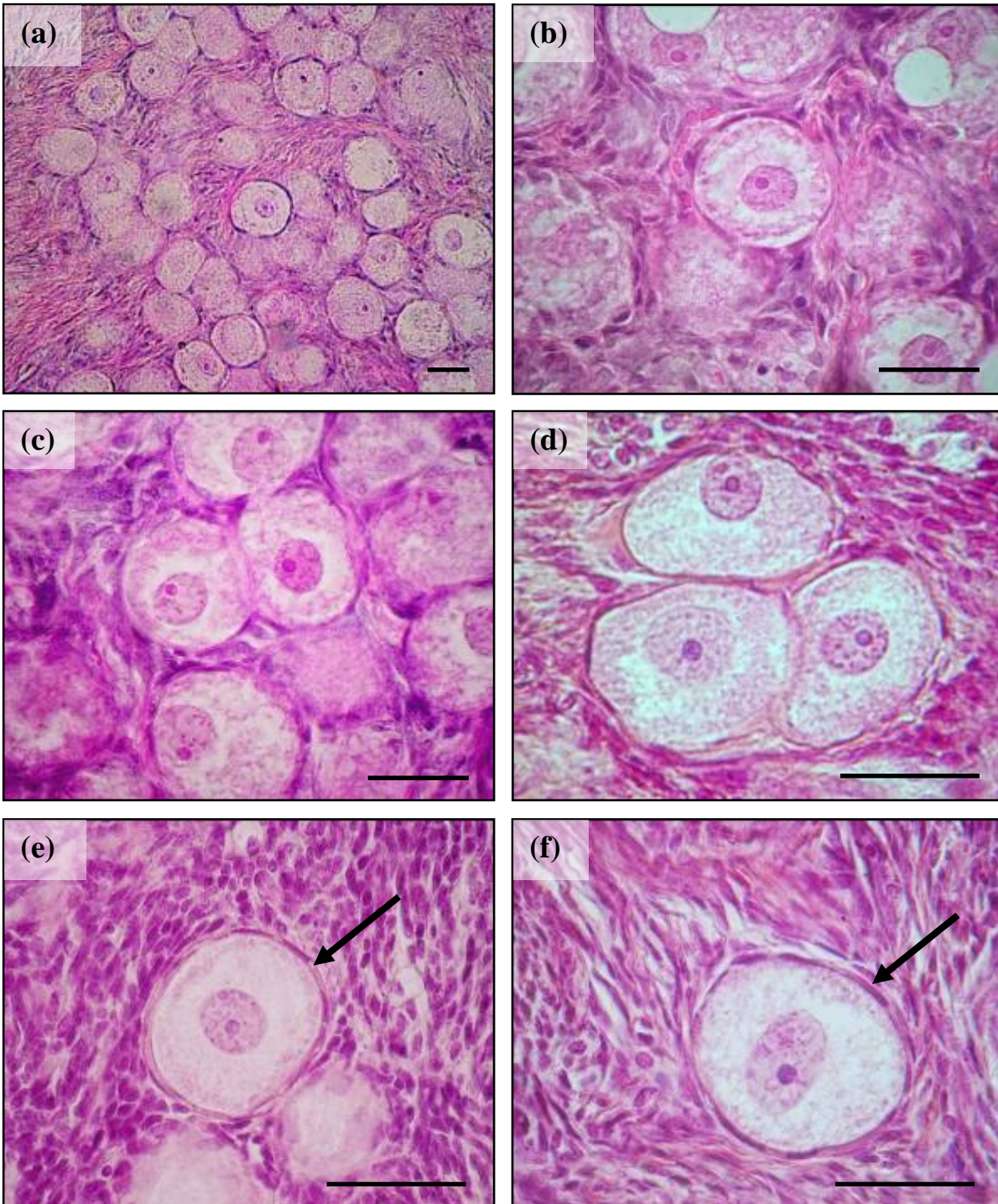


FIGURE 10 : Follicules primaires de chatte en microscopie optique.

Les cellules folliculaires prolifèrent pour former un follicule intermédiaire (figure a), puis un follicule primaire (figures b-f). Les follicules primaires sont constitués d'un ovocyte entouré d'une couche de cellules folliculaires cuboïdales (flèche, figures e-f). A ce stade, la zone pellucide n'est pas visible.

La barre d'échelle représente 50 μ m.

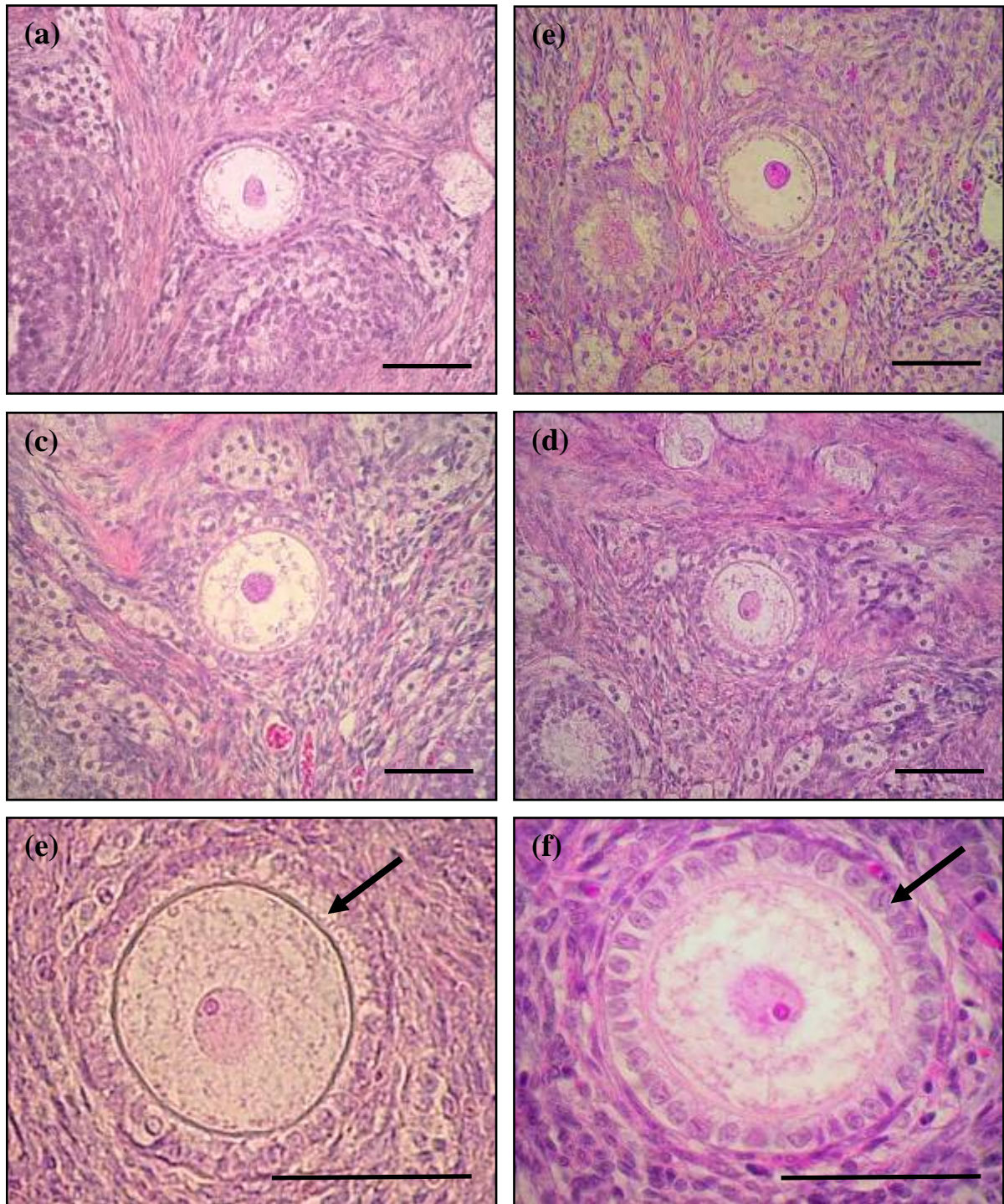


FIGURE 11 : Follicules secondaires de chatte en microscopie optique.

Les follicules secondaires (figures a-f) sont constitués d'un ovocyte entouré de deux couches de cellules folliculaires. La zone pellucide devient bien visible (flèche, figures e-f).

La barre d'échelle représente 50 μ m.

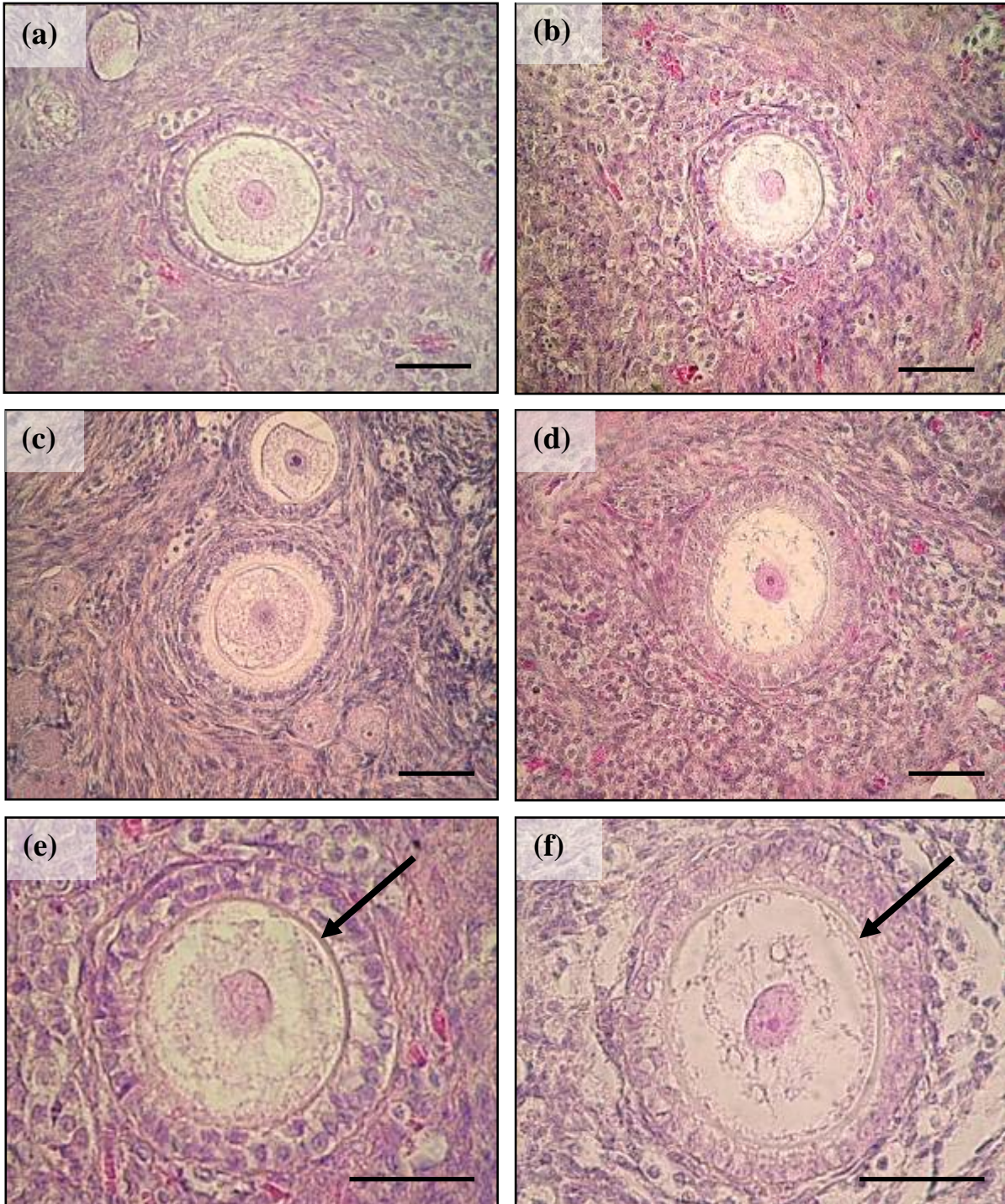


FIGURE 12 : Follicules pré-antraux de chatte en microscopie optique.

Les follicules pré-antraux sont constitués d'un ovocyte entouré de trois (figures a-c) à plus de cinq couches de cellules folliculaires (figures d-f). La zone pellucide est bien visible (flèche, figures e-f). A sein des cellules folliculaires des plus grands follicules (figures e-f), on distingue les cellules de la granulosa (*) et les cellules thécales (#).

La barre d'échelle représente 50 μ m.

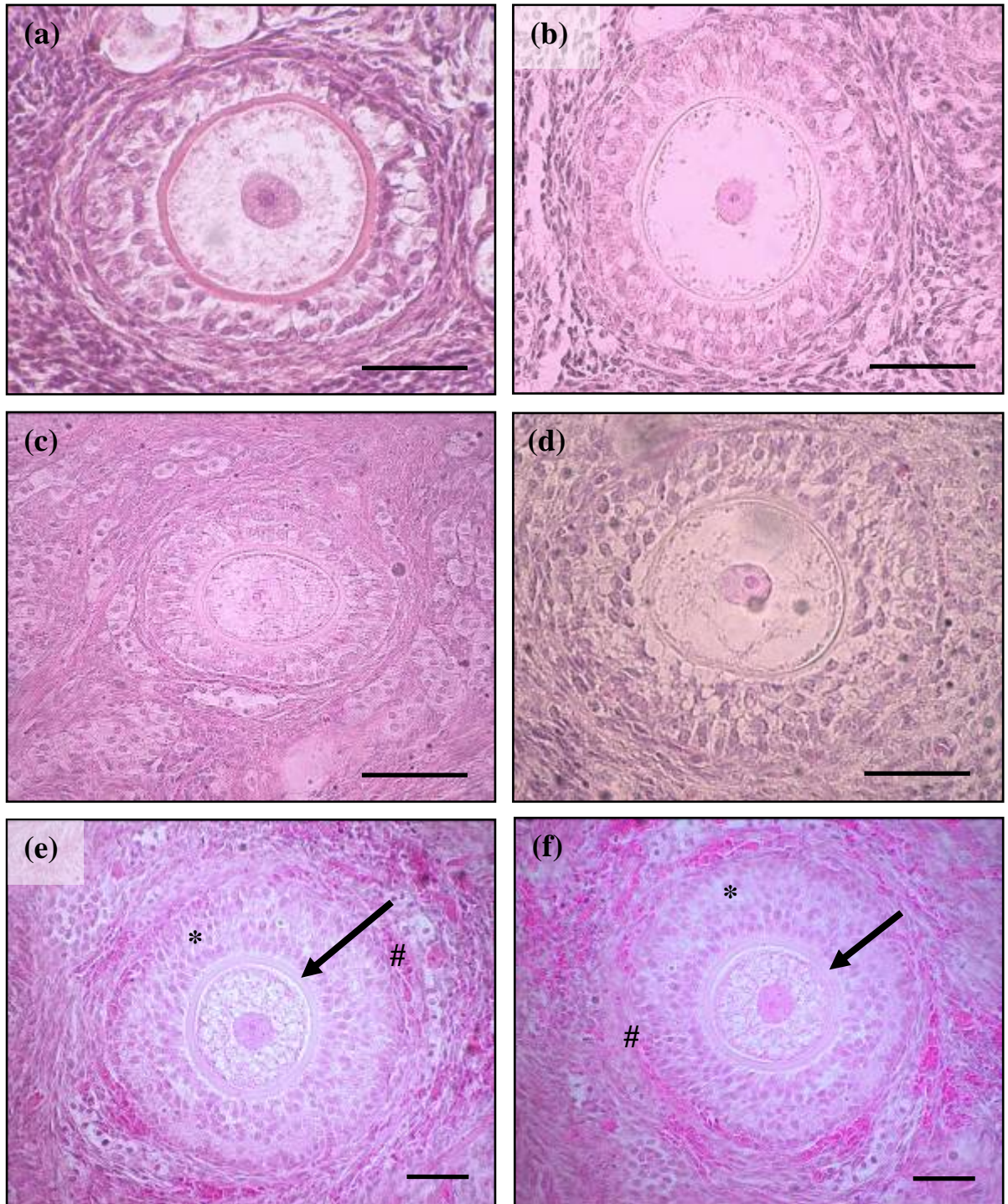


FIGURE 13 : Follicules antraux de chatte en microscopie optique.

La formation de l'antrum (flèche, figures e-f) débute par l'apparition de petites cavités au sein des cellules de la granulosa (figures a-d). Progressivement, ces cavités s'agrandissent et deviennent coalescentes ; l'ovocyte n'est alors plus en contact qu'avec une seule couche de cellules de la granulosa appelée corona radiata (+) (figures e-f). Les cellules de la granulosa et de la thèque sont bien différenciées.

La barre d'échelle représente 100 μ m.

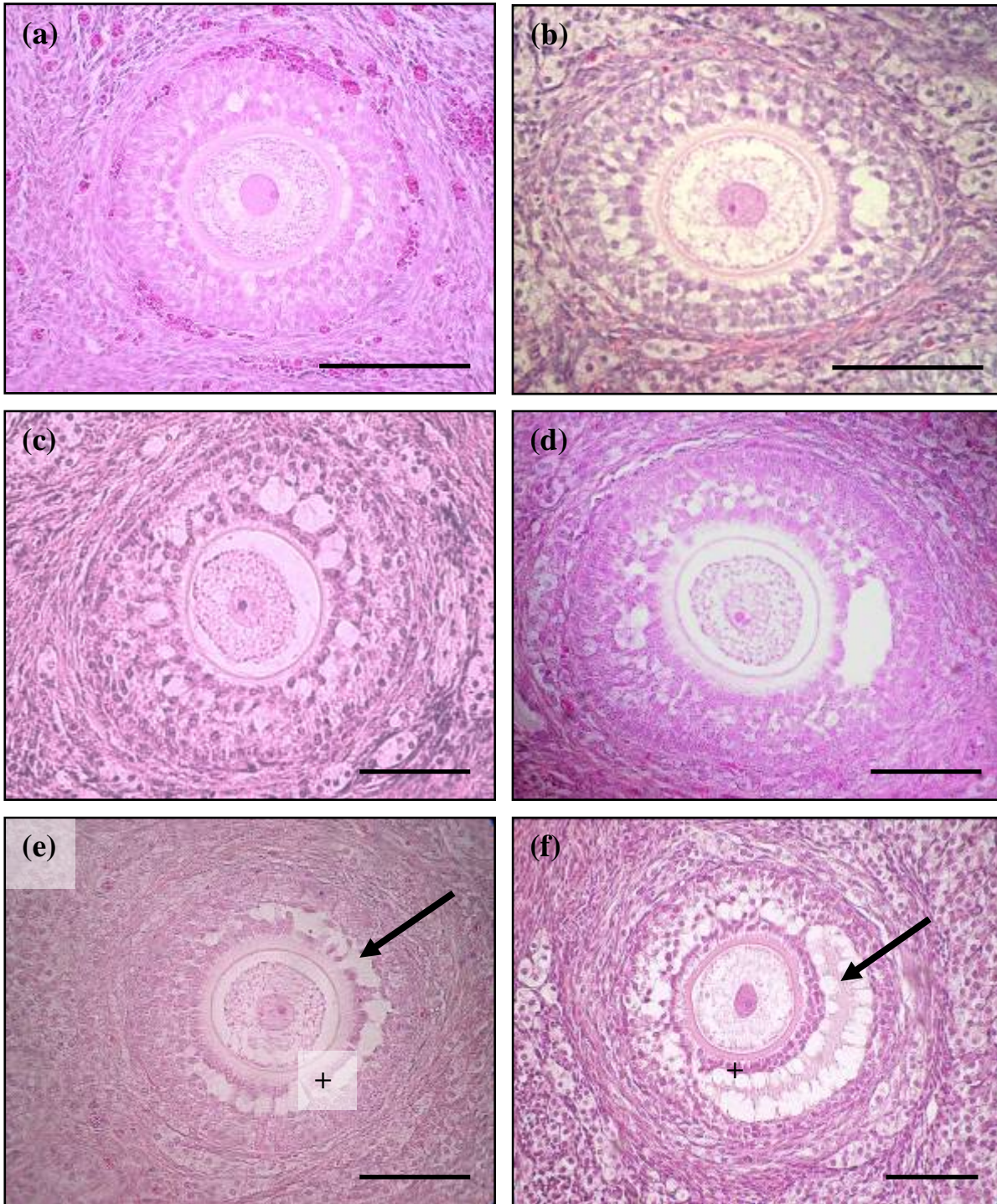
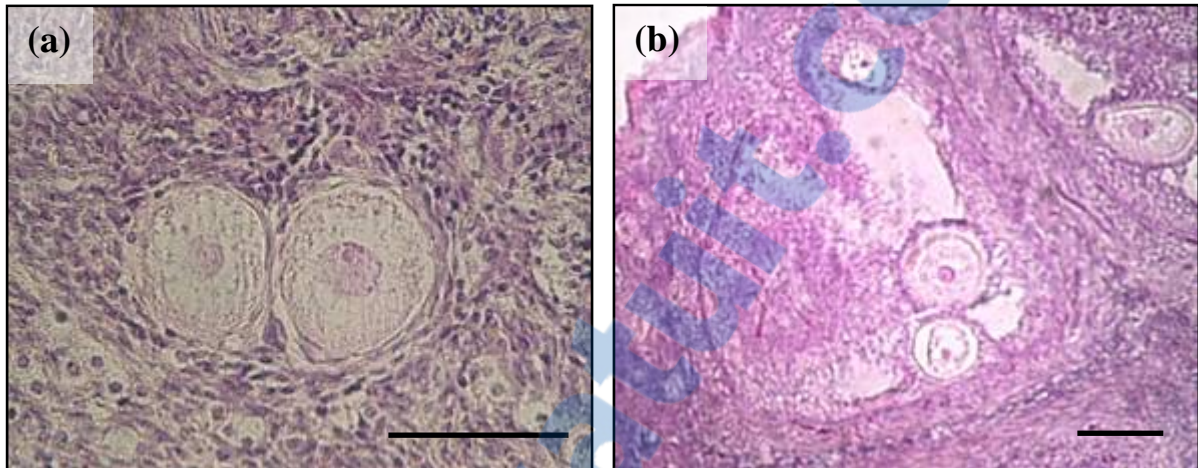


FIGURE 14 : Follicules polyovocytaires de chatte en microscopie optique.

Les follicules primordiaux (figure a) contenant deux ovocytes constituent la majorité des follicules polyovocytaires. On peut toutefois observer des follicules polyovocytaires de stade plus avancé (figure b, follicule antral contenant trois ovocytes).

La barre d'échelle représente 50 μm pour la figure a, et 100 μm pour la figure b.



Dès la formation de l'antrum, la croissance ovocytaire semblait plus lente que la croissance du follicule. Suivant le même modèle, elle peut être représentée par la formule suivante :

$$y = 0,10x + 85,68$$

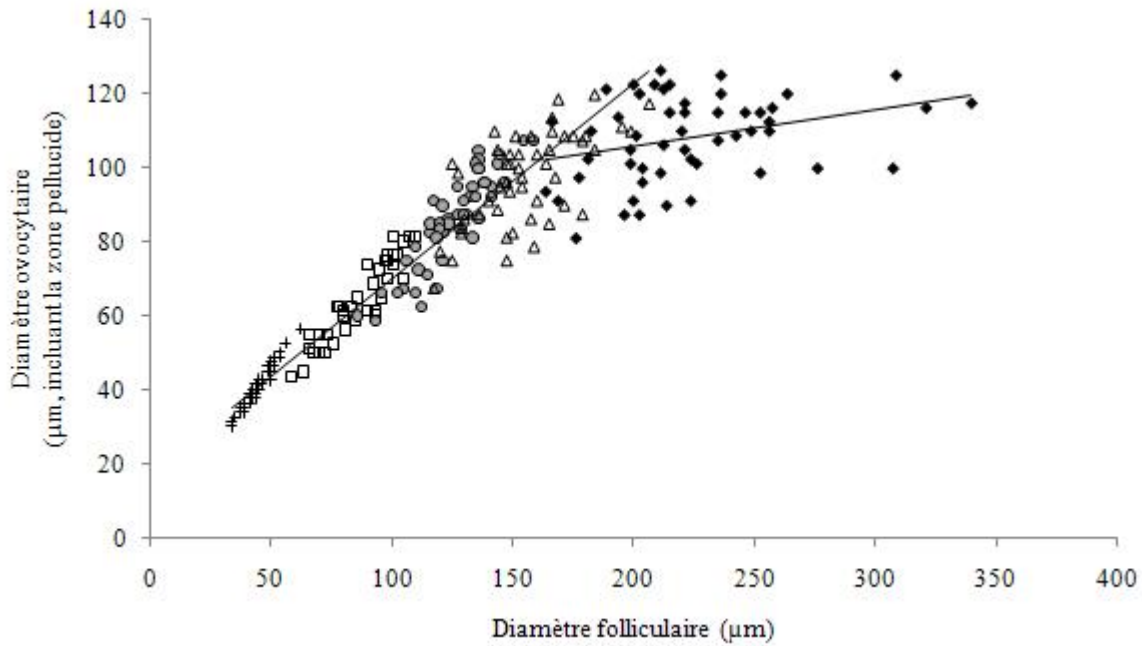
La corrélation entre la croissance folliculaire et la croissance ovocytaire devient cependant beaucoup plus faible ($r^2 = 0,11$, $P < 0,015$).

Ce modèle présente néanmoins l'intérêt d'estimer le diamètre moyen du follicule lors de la formation de l'antrum. Ainsi, l'intersection des deux droites correspond à un follicule de 159,6 μm de diamètre pour un diamètre ovocytaire de 102 μm .

FIGURE 15 : Relation entre les diamètres folliculaires et ovocytaires dans les premiers stades de la folliculogénèse (follicules primordiaux à jeunes follicules antraux).

Les follicules primordiaux sont représentés par des croix (n = 52), les follicules primaires par des rectangles (n = 53), les follicules secondaires par des ronds (n = 50), les follicules pré-antraux par des triangles (n = 50) et les jeunes follicules antraux par des losanges (n = 52).

La première droite (à gauche) modélise la croissance ovocytaire des follicules primordiaux à pré-antraux tandis que la seconde (à droite) représente la croissance ovocytaire des follicules antraux.

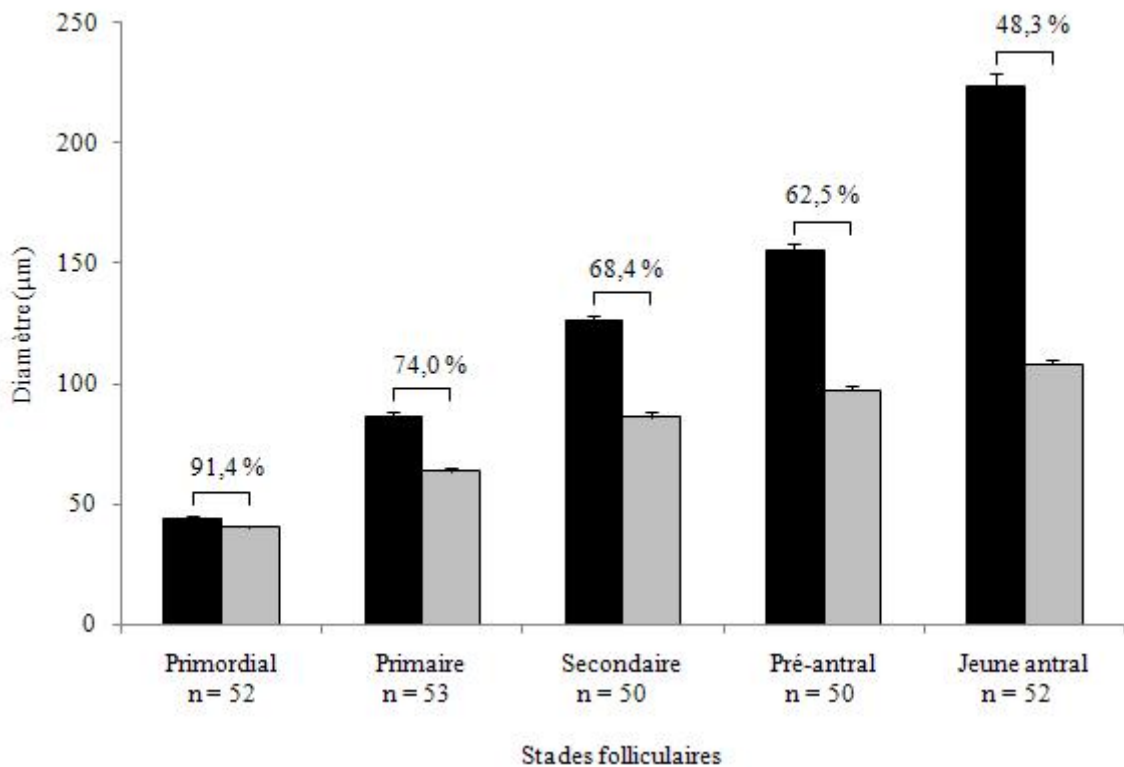


La figure 16 permet également d'apprécier la disproportion entre la croissance folliculaire et ovocytaire. Alors que la taille du follicule primordial était déterminée par la taille de l'ovocyte qu'il contient (celui-ci représentait alors plus de 90 % de son diamètre maximal), le diamètre ovocytaire ne représentait plus que la moitié du diamètre d'un jeune follicule antral (108,1 µm en moyenne pour un jeune follicule antral de 223,8 µm de diamètre).

FIGURE 16 : Evolution des diamètres folliculaires et ovocytaires en fonction du stade folliculaire (follicules primordiaux à jeunes follicules antraux).

Les histogrammes représentent les diamètres folliculaires (en noir) ou ovocytaires (en gris) moyens. Les barres d'erreur indiquent la SEM correspondante.

Au-dessus de chaque classe folliculaire est indiqué le pourcentage du diamètre folliculaire représenté par le diamètre ovocytaire. Le nombre de follicules mesurés pour chaque classe folliculaire est indiqué sous l'axe des abscisses (n).

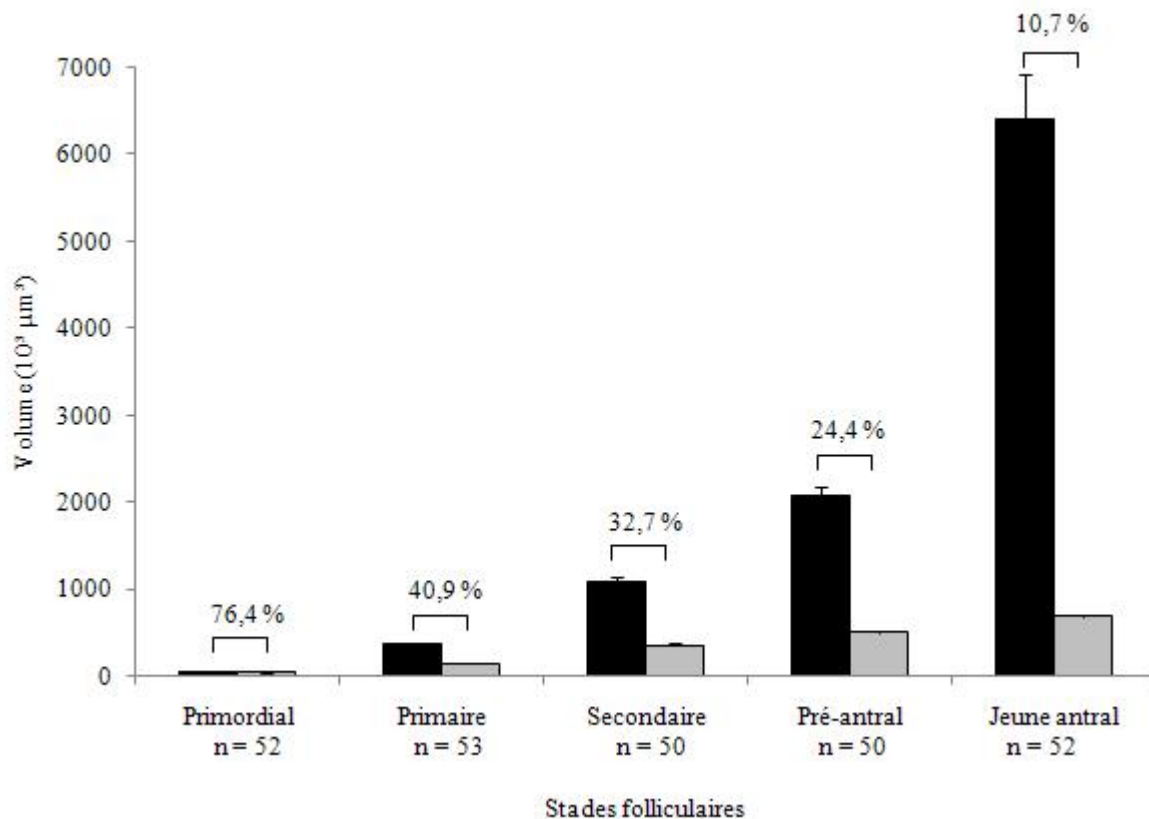


Cette disproportion est plus facile à apprécier lorsque l'on estime le pourcentage du volume folliculaire occupé par l'ovocyte (figure 17). Ainsi, plus de 75 % du volume du follicule primordial était représenté par l'ovocyte, tandis que le volume de l'ovocyte ne représentait plus que 10 % environ du volume folliculaire total pour les jeunes follicules antraux (en prenant comme volume $\frac{4}{3} \pi R^3$ avec $R = \text{diamètre ovocytaire ou folliculaire} / 2$).

FIGURE 17 : Evolution du pourcentage du volume folliculaire représenté par l'ovocyte (follicules primordiaux à jeunes follicules antraux).

Les histogrammes représentent les volumes folliculaires (en noir) ou ovocytaires (en gris) moyens. Les barres d'erreur indiquent la SEM correspondante.

Au-dessus de chaque classe folliculaire est indiqué le pourcentage du volume folliculaire représenté par le volume ovocyttaire. Le nombre de follicules mesurés pour chaque classe folliculaire est indiqué sous l'axe des abscisses (n).



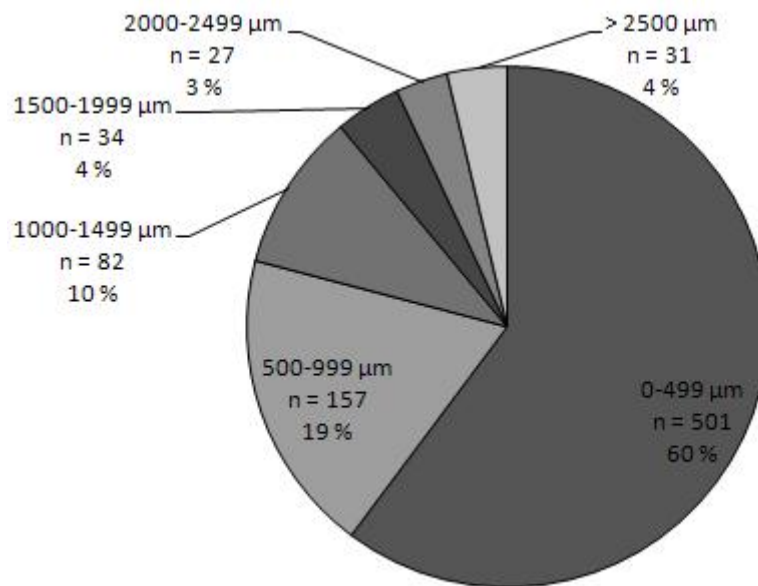
2.3.2. TOUS STADES FOLLICULAIRES CONFONDUS

Dans un second temps, 575 follicules supplémentaires ont été observés et leurs diamètres folliculaires et ovocytaires respectifs ont été mesurés. Au total, 832 follicules ont été inclus dans l'étude. Il s'agissait ici de déterminer la relation qui lie la croissance ovocyttaire à celle du follicule tout au long de la folliculogenèse sur un plus grand effectif. Tous les stades folliculaires étaient représentés. Ainsi le plus petit follicule mesuré avait un diamètre de 33,8 μm et le plus grand qui ait été observé au cours de cette étude mesurait 3600

μm . Ce dernier provenait de l'ovaire d'une chatte qui présentait un comportement d'œstrus depuis plusieurs jours. La figure 18 montre la répartition des follicules mesurés en fonction de leur taille.

FIGURE 18 : Répartition de l'ensemble des follicules mesurés en fonction de leur taille.

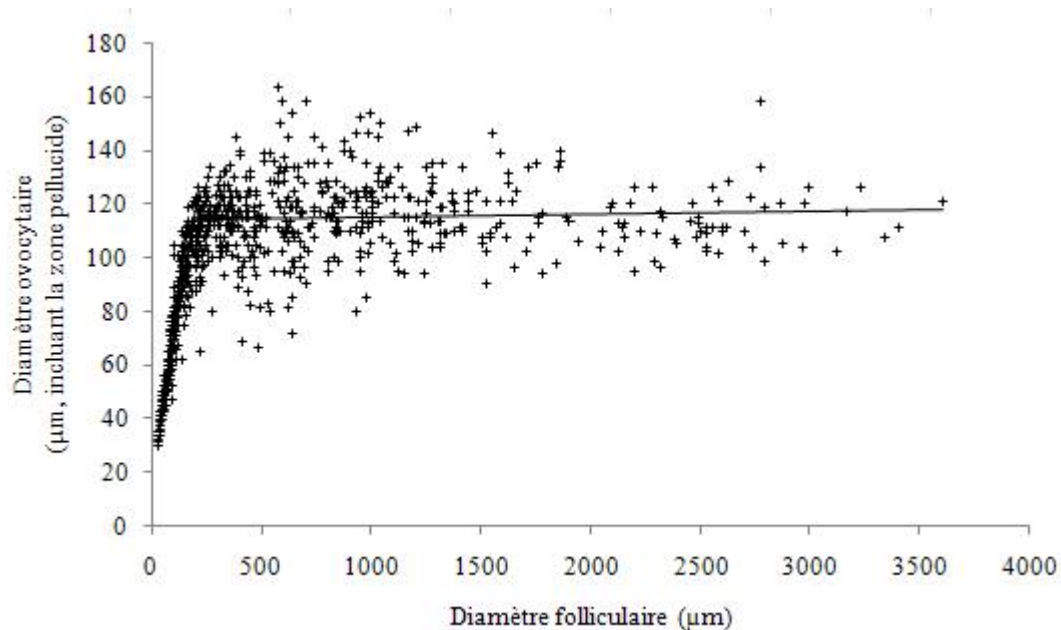
Sous chaque classe folliculaire sont indiqués le nombre de follicules mesurés (n) ainsi que la proportion qu'ils représentent au sein de l'effectif total (%).



La première partie de cette étude a montré que la croissance de l'ovocyte était ralentie par rapport à celle du follicule à partir de l'apparition de l'antrum. De plus, la formation de l'antrum semble débiter pour des follicules dont le diamètre se situe autour de $160 \mu\text{m}$ en moyenne. Néanmoins, pour des diamètres folliculaires compris entre $160 \mu\text{m}$ et $206 \mu\text{m}$, nous avons observé à la fois des follicules pré-antraux et des follicules antraux. Tous les follicules de plus de $206 \mu\text{m}$ que nous avons mesurés contenaient un antrum. Nous avons donc choisi d'étudier séparément les follicules mesurant moins de $200 \mu\text{m}$ ($n = 287$) et les follicules de diamètre supérieur ($n = 545$). La figure 19 présente la croissance du diamètre de l'ovocyte en fonction du diamètre folliculaire sur l'ensemble de la folliculogénèse.

FIGURE 19 : Relation entre les diamètres folliculaires et ovocytaires tous stades folliculaires confondus.

La première droite (à gauche) modélise la croissance ovocytaire des follicules mesurant moins de 200 μm de diamètre ($n = 287$) tandis que la seconde (à droite) représente la croissance ovocytaire des follicules de diamètre supérieur ($n = 545$).



La taille de l'ovocyte inclus dans les follicules mesurant moins de 200 μm de diamètre a été mesurée. La relation qui lie les diamètres ovocytaire et folliculaire peut être modélisée par une régression linéaire d'équation :

$$y = 0,500x + 20,01$$

avec $r^2 = 0,89$ ($P < 0,0001$). Cette corrélation est approximativement similaire à celle qui liait le diamètre ovocytaire au diamètre des follicules pré-antraux lors de l'étude précédente ($y = 0,526x + 17,68$).

De même, dans les follicules dont le diamètre était supérieur à 200 μm , le diamètre ovocytaire suivait la croissance suivante :

$$y = 0,001x + 114,39$$

Pour ces grands follicules, la taille de l'ovocyte n'est pas liée au diamètre folliculaire de façon significative ($r^2 = 0,01$, $P = 0,20$). Les valeurs mesurées sont dispersées autour de la droite modélisée.

Il apparaît donc qu'au sein des follicules de petite taille (inférieurs à 200 μm de diamètre) l'ovocyte croît approximativement deux fois moins vite que le follicule (pente de 0,5). Pour les follicules antraux (supérieurs à 200 μm), la croissance de l'ovocyte est mille fois moindre que celle du follicule (pente de 0,001).

L'intersection des deux droites correspond à un follicule de 189,1 μm entourant un ovocyte de 114,6 μm . Cette première valeur représente le diamètre folliculaire à partir duquel la croissance de l'ovocyte est fortement ralentie par rapport à celle du follicule. Ce diamètre est proche de celui déterminé selon le même principe pour la formation de l'antrum dans la première partie de l'étude (159,6 μm).

A la fin de la folliculogénèse (follicules supérieurs à 2500 μm , $n = 31$), l'ovocyte atteint un diamètre maximal de $115,00 \pm 2,21$ μm en moyenne (de 99 μm à 159 μm). Lors de la formation de l'antrum, l'ovocyte mesure donc 89 % de son diamètre final, ce qui représente 70 % de son volume final.

2.4. APPARITION ET EVOLUTION DE L'ÉPAISSEUR DE LA ZONE PELLUCIDE

2.4.1. SELON LE STADE FOLLICULAIRE

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'épaisseur de la zone pellucide pour chaque follicule dont le stade histologique avait été préalablement déterminé ($n = 257$). Les résultats sont indiqués dans le tableau 4.

La zone pellucide n'était pas visible dans les follicules primordiaux et primaires. Son épaisseur était en moyenne de 2,7 μm pour les follicules secondaires, puis elle augmentait progressivement jusqu'à une épaisseur de 3,4 μm en moyenne pour les jeunes follicules antraux, 5,6 μm étant la valeur maximale mesurée pour un jeune follicule antral. Sa taille était significativement différente entre deux stades folliculaires successifs ($P < 0,0001$).

TABLEAU 4 : Epaisseur de la zone pellucide dans les premiers stades folliculaires.

Pour chaque stade folliculaire, les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs entre parenthèses indiquent les diamètres minimum et maximum mesurés.

Les valeurs dont l'exposant (lettres a-d) est différent sont significativement différentes ($P < 0,0001$).

Stade folliculaire	n	Epaisseur de la zone pellucide (μm)
Primordial	52	0 ^a
Primaire	53	0 ^a
Secondaire	50	2,7 \pm 0,1 ^b (1,3-4,4)
Pré-antral	50	3,3 \pm 0,1 ^c (2,5-5,0)
Jeune antral	52	3,4 \pm 0,1 ^d (1,9-5,6)

2.4.2. TOUS STADES FOLLICULAIRES CONFONDUS

L'épaisseur de la zone pellucide de 343 follicules supplémentaires, tous stades confondus, a été mesurée. Au total, 600 follicules de 33,8 μm à 3600 μm ont été inclus dans l'étude. Les résultats sont synthétisés dans la figure 20.

La zone pellucide n'était pas visible dans les follicules mesurant moins de 90 μm de diamètre ($n = 82$). Le plus petit follicule qui possédait un ovocyte entouré d'une zone pellucide mesurait 93,8 μm . Par contre, tous les follicules de plus de 110 μm de diamètre ($n = 488$) comprenaient une zone pellucide. Pour les follicules de plus de 2500 μm de diamètre, l'épaisseur de la zone pellucide était comprise entre 2,5 μm et 10,6 μm , avec une moyenne de 5,9 μm ($n = 25$). L'épaisseur maximale mesurée au cours de cette étude était de 15 μm dans un follicule de 1862 μm .

L'épaisseur de la zone pellucide augmentait rapidement jusqu'à ce que le follicule ait atteint un diamètre de 200 μm ($n = 220$). Sa taille peut alors être modélisée par la relation linéaire suivante :

$$y = 0,023x - 1,028$$

avec x le diamètre folliculaire et y l'épaisseur de la zone pellucide. Le coefficient de détermination était alors relativement élevé ($r^2 = 0,67$, $P < 0,0001$).

La croissance en épaisseur de la zone pellucide semble ralentie pour les follicules mesurant plus de 200 μm ($n = 380$) par rapport aux follicules de plus petit diamètre. Elle suit alors la relation suivante :

$$y = 0,0005x + 3,368$$

Cependant, le coefficient de détermination est alors très faible ($r^2 = 0,07$, $P < 0,0001$), ce qui signifie que l'épaisseur de la zone pellucide n'est très faiblement corrélée au diamètre folliculaire.

L'intersection des deux courbes ainsi modélisées correspond à un follicule de 199,8 μm , taille à partir de laquelle la croissance de la zone pellucide est donc ralentie. Ce diamètre est très proche de celui à partir duquel la croissance ovocytaire était diminuée (189,1 μm).

L'épaisseur de la zone pellucide ne montre aucune corrélation avec le diamètre de l'ovocyte, mesuré sans tenir compte de la zone pellucide (figure 21).

FIGURE 20 : Epaisseur de la zone pellucide au cours du développement folliculaire.

L'épaisseur moyenne de la zone pellucide est représentée pour chaque classe folliculaire ($n = 600$ follicules). La barre d'erreur représente la SEM. Les chiffres placés au-dessus de chaque point indiquent le nombre de follicules mesurés dans chaque classe.

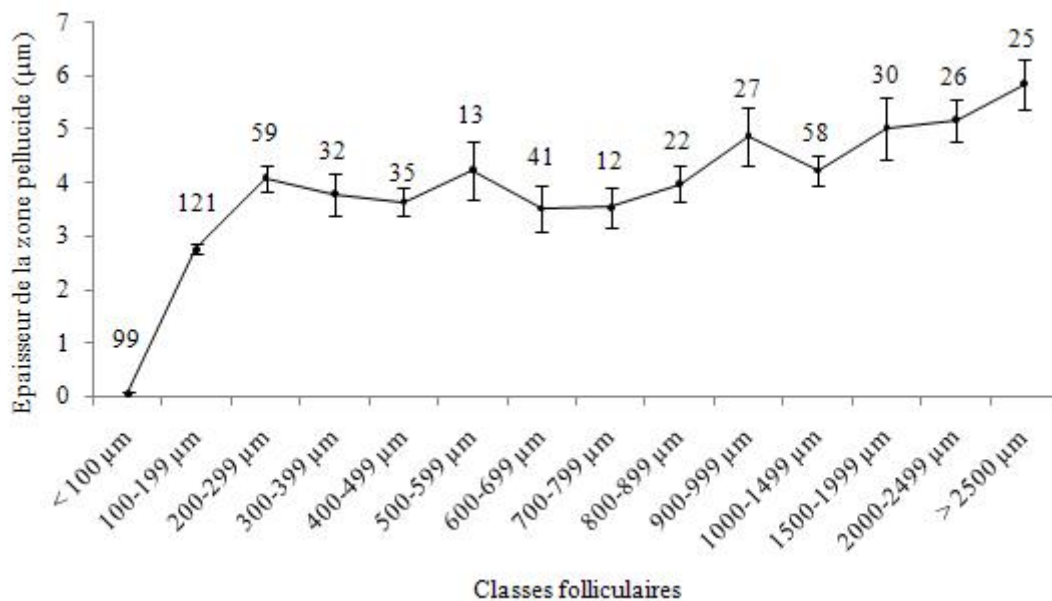
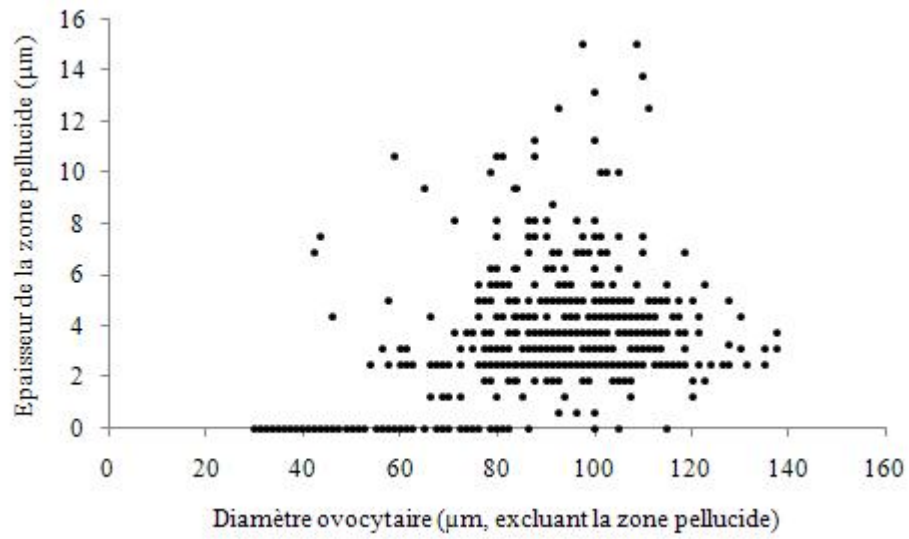


FIGURE 21 : Epaisseur de la zone pellucide en fonction du diamètre ovocytaire.

Au total, 600 follicules de 33,8 à 3600 μm ont été mesurés.



3. DISCUSSION

3.1. CROISSANCES FOLLICULAIRE ET OVOCYTAIRE

Cette étude a permis de déterminer le diamètre du follicule et de l'ovocyte en relation avec le stade de développement folliculaire chez la chatte, au cours des premiers stades de la folliculogénèse.

3.1.1. CROISSANCE FOLLICULAIRE

Dans cette étude, le diamètre moyen d'un follicule primordial (une couche de cellules de la granulosa aplaties) était de $44,3 \pm 0,85 \mu\text{m}$, et celui d'un follicule primaire (une couche de cellules de la granulosa cuboïdales) de $86,2 \pm 1,8 \mu\text{m}$. Ces résultats sont en accord avec ceux de Jewgenow et Fickel (1999), qui ont estimé la taille du follicule primaire à 70-80 μm chez la chatte. Ils sont cependant supérieurs à ceux obtenus dans d'autres études, dans lesquelles les follicules primordiaux et primaires mesuraient de 40 à 50 μm (Jewgenow et Goritz, 1995 ; Jewgenow, 1998 ; Jewgenow et Paris, 2006). Cependant, la méthode utilisée dans ces précédentes études était différente : les follicules étaient mesurés après culture *in vitro*, fixation au glutaraldéhyde et observation au microscope à fluorescence. En outre, ils n'avaient pas fait l'objet d'une section au microtome.

Gosden et Telfer (1987b) ont comparé le développement folliculaire chez 22 espèces de mammifères. Ils ont montré qu'il existe une relation allométrique entre le diamètre du follicule primordial et le poids moyen des individus de l'espèce considérée : la taille des follicules primordiaux augmente avec le poids de l'animal. Dans cette étude, le diamètre moyen des follicules primordiaux était relativement important chez la chatte et la lapine. En effet, dans notre étude, le diamètre moyen du follicule primordial était largement supérieur aux valeurs observées chez d'autres espèces dont le poids moyen excède celui de la chatte. Par exemple, il est de $25,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$ chez la chienne (Songsasen *et al.*, 2009) et de $35,4 \pm 6,2 \mu\text{m}$ chez la femme (Gougeon et Chainy, 1987). Il est à noter que l'objet de l'étude de Gosden et Telfer (1987b) était de déterminer les variations interspécifiques du diamètre folliculaire.

Ces considérations ne concernent pas les variations entre des individus d'une même espèce et ne permettent donc pas de conclure que le diamètre des follicules primordiaux est plus important chez les animaux les plus lourds au sein d'une même espèce.

Les diamètres moyens des follicules entourés de deux couches de cellules de la granulosa (follicules secondaires) ou plus de deux couches de cellules de la granulosa et où l'antrum n'était pas visible (follicules pré-antraux) étaient respectivement de $126,0 \pm 2,2 \mu\text{m}$ et $155,6 \pm 2,9 \mu\text{m}$. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus dans la plupart des autres études menées chez la chatte, qui indiquent que les follicules pré-antraux mesurent en moyenne 60 à 100 μm de diamètre (Jewgenow et Goritz, 1995 ; Jewgenow, 1998). Par contre, Bristol-Gould et Woodruff (2006) ont observé des follicules pré-antraux mesurant jusqu'à 400 μm alors que, dans notre étude, tous les follicules de plus de 206 μm présentaient une cavité antrale.

A titre de comparaison, le diamètre moyen d'un follicule pré-antral est de 50 à 125 μm chez la souris (Brambell, 1928), 115 à 180 μm chez la femme (Gougeon, 1984), 80 à 250 μm chez la vache (Braw-Tal et Yossefi, 1997) et 130 μm chez la chienne (Songsasen *et al.*, 2009).

Les petits follicules antraux observés au cours de notre étude mesuraient $223,8 \pm 5,3 \mu\text{m}$ en moyenne. A notre connaissance, c'est la première étude qui s'est attachée à décrire le diamètre de ces follicules chez la chatte. Ce diamètre est supérieur à la taille des jeunes follicules antraux chez la souris (200 μm , Brambell, 1928), et inférieurs à la taille des jeunes follicules antraux chez la chienne (230 μm , Songsasen *et al.*, 2009) et chez la femme (180 à 400 μm , Gougeon, 1984).

Griffin *et al.* (2006) ont comparé le diamètre moyen des follicules selon le stade folliculaire chez la souris, le hamster, la truie et la femme (tableau 5). Ils ont montré que la taille des follicules primordiaux était significativement différente chez ces 4 espèces, de même que pour les follicules antraux. Par contre, pour les follicules primaires et les follicules pré-antraux, il n'existait pas de différence significative entre ces espèces.

TABLEAU 5 : Comparaison des diamètres folliculaires moyens selon le stade folliculaire chez 4 espèces de mammifères (souris, hamster, truie et femme) (*d'après Griffin et al., 2006*).

Stade folliculaire	Diamètre folliculaire			
	Souris	Hamster	Truie	Femme
Primordial	17 µm	26 µm	34 µm	44 µm
Primaire	52 µm	56 µm	65 µm	70 µm
Pré-antral	104 µm	125 µm	102 µm	114 µm
Jeune antral	187 µm	305 µm	359 µm	302 µm

Enfin, le plus grand follicule que nous avons observé mesurait 3 600 µm. Sur la base de la littérature, nous avons considéré que ce diamètre représentait la taille du follicule pré-ovulatoire. Pour Goodrowe *et al.* (1988, 1989), les follicules pré-ovulatoires mesurent de 2 à 5 mm chez la chatte. Malandain *et al.* (2006) ont suivi la croissance des grands follicules par échographie lors des chaleurs chez la chatte : les follicules pré-ovulatoires mesuraient en moyenne $3,0 \pm 0,01$ mm. Cette étude a également permis de montrer que, chez la chatte, le follicule atteignait sa taille maximale 1 à 8 jours après le début des chaleurs (3,8 jours en moyenne).

L'étude menée par Gosden et Telfer (1987b) a montré qu'il existe en outre une relation allométrique entre la surface du follicule pré-ovulatoire et le poids moyen des individus de l'espèce considérée : la taille des follicules pré-ovulatoires augmente avec le poids de l'animal. Cette relation est encore plus significative lorsque l'on considère l'ensemble des follicules pré-ovulatoires : la surface totale représentée par les follicules pré-ovulatoires dans un même ovaire est corrélée au poids moyen de l'espèce.

Si l'on compare les valeurs disponibles pour le diamètre ovulatoire chez la chatte aux données synthétisées par Monniaux *et al.* (1997) chez différentes espèces (tableau 6), la relation avec le poids de l'espèce se vérifie globalement, sauf chez la vache et chez la femme. En moyenne, le diamètre du follicule pré-ovulatoire dans l'espèce féline (autour de 3 mm) est supérieur à celui de la lapine (0,8 à 1 mm), et inférieur à celui de la chienne (4 à 6 mm).

TABLEAU 6 : Comparaison des diamètres du follicule pré-ovulatoire chez 8 espèces de mammifères (souris, rat, hamster, lapine, chienne, chèvre, vache et femme) (*d'après Monniaux et al., 1997*).

Espèce	Diamètre folliculaire pré-ovulatoire
Souris - Rat - Hamster	0,6-0,8 mm
Lapine	0,8-1 mm
Chienne	4-6 mm
Chèvre	6-7 mm
Vache	10-20 mm
Femme	20 mm

3.1.2. CROISSANCE OVOCYTAIRE

Nous avons choisi de mesurer le diamètre ovocytaire en incluant la ZP lorsqu'elle était présente. En effet, nous avons remarqué que les plus grands ovocytes semblaient souvent abîmés. L'aspect « arraché » de certains ovocytes tend à mettre en cause la coupe au microtome dans l'établissement de telles lésions, l'ovocyte constituant l'une des régions les plus fragiles du follicule. La ZP semblait au contraire conserver sa forme et sa position initiales. C'est pourquoi nous avons considéré comme limite l'extérieur de la ZP, et non la membrane cytoplasmique de l'ovocyte.

Dans notre étude, le diamètre moyen des ovocytes inclus dans les follicules primordiaux était de $40,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$, et celui des ovocytes inclus dans les follicules primaires était de $63,8 \pm 1,4 \mu\text{m}$. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Bristol-Gould et Woodruff (2006) qui s'élevaient respectivement à 20-30 μm et 30-50 μm .

De plus, ce diamètre semble relativement important par rapport aux autres espèces étudiées. Ainsi, chez la souris, la chienne, la chèvre, la vache et la femme, les diamètres moyens des ovocytes inclus dans les follicules primordiaux sont respectivement de 13 μm (Brambell,

1928), $18,5 \pm 1,0 \mu\text{m}$ (Songsasen *et al.*, 2009), $28,6 \pm 3,5 \mu\text{m}$ (Cognie *et al.*, 1998), $29,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Braw-Tal et Yossefi, 1997) et $32,1 \pm 6,0 \mu\text{m}$ (Gougeon et Chainy, 1987).

Dans notre étude, les ovocytes inclus dans les follicules secondaires, pré-antraux et jeunes antraux mesuraient respectivement $86,2 \pm 1,8 \mu\text{m}$, $97,3 \pm 1,8 \mu\text{m}$ $108,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$. Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux obtenus par Bristol-Gould et Woodruff (2006) chez la chatte. Ils ont en effet estimé les diamètres des ovocytes contenus dans les follicules pré-antraux et antraux à $40-70 \mu\text{m}$ et $75-90 \mu\text{m}$ respectivement. Néanmoins, leur étude ne précise pas si leurs mesures incluaient ou non la ZP, qui apparaît chez les follicules secondaires.

En outre, ces valeurs sont, une fois encore, supérieures à celles observées chez les autres espèces. Ainsi, chez la chienne (Songsasen *et al.*, 2009) et chez la vache (Braw-Tal et Yossefi, 1997), les diamètres moyens des ovocytes issus des follicules pré-antraux sont respectivement de $60,5 \pm 2,7 \mu\text{m}$ et $68,61 \pm 2,78 \mu\text{m}$, et de $91,2 \pm 3,8 \mu\text{m}$ et $92,9 \pm 4,5 \mu\text{m}$ pour les jeunes follicules antraux.

Griffin *et al.* (2006) ont également comparé le diamètre moyen des ovocytes (ZP comprise) selon le stade folliculaire chez la souris, le hamster, la truie et la femme (tableau 7). Ils ont montré que la taille des ovocytes était significativement différents entre les 4 espèces pour tous les stades folliculaires, sauf pour les follicules pré-antraux, dont le diamètre des ovocytes est similaire chez la femme et la truie.

TABLEAU 7 : Comparaison des diamètres ovocytaires moyens (ZP comprise) selon le stade folliculaire chez 4 espèces de mammifères (souris, hamster, truie et femme) (*d'après Griffin et al., 2006*).

Stade folliculaire	Diamètre ovocyttaire			
	Souris	Hamster	Truie	Femme
Primordial	13 μm	23 μm	29 μm	36 μm
Primaire	29 μm	32 μm	37 μm	42 μm
Pré-antral	54 μm	64 μm	74 μm	73 μm
Jeune antral	67 μm	81 μm	93 μm	120 μm

Nous avons estimé que le diamètre ovocytaire (ZP incluse) était de 115 μm juste avant l'ovulation, à partir du diamètre moyen des ovocytes contenus dans les follicules de plus de 500 μm . Dans leur étude, Goodrowe *et al.* (1988) ont estimé le diamètre maximal de l'ovocyte (comprenant la ZP) à $162,4 \pm 2,9 \mu\text{m}$ chez la chatte, ce qui est supérieur à nos observations. Cette différence peut s'expliquer en partie par la préparation histologique. Iwaware *et al.* (1984) ont étudié l'effet de la méthode utilisée lors de la préparation des lames histologiques sur les dimensions des tissus. Ils ont utilisé des petits fragments de reins et de foies de bovins, qu'ils ont inclus en paraffine par une technique similaire à celle que nous avons mise en œuvre dans notre étude. Ils ont montré que la taille finale de ces fragments après préparation était de 12 % à 16 % inférieure à leur dimension initiale. Au contraire, dans l'étude menée par Goodrowe *et al.*, les auteurs ont mesuré des ovocytes dans leur milieu de culture, en dehors de toute préparation histologique. En outre, les ovocytes avaient été récoltés par aspiration sous contrôle endoscopique et après stimulation ovarienne, ce qui pourrait également modifier les diamètres ovocytaires. Notre étude semble donc plus proche des conditions physiologiques puisqu'elle s'est attachée à décrire des follicules et des ovocytes *in situ* (inclus dans l'ovaire) et en dehors de tout traitement gonadotrope, mais elle présente l'inconvénient de subir le biais de la préparation histologique qu'elle requiert.

Gosden et Telfer (1987b) ont montré que le diamètre des ovocytes inclus dans les grands follicules antraux était corrélé au poids moyen de l'espèce de façon significative chez 22 espèces de mammifères, dont la chatte. Dans leur étude, le diamètre moyen des ovocytes inclus dans les follicules pré-ovulatoires de chatte était cependant relativement important par rapport aux autres espèces : il était par exemple supérieur à celui de la vache, de la jument et de la femme. D'après les données de la bibliographie et les résultats de notre étude, nous n'avons toutefois pas pu confirmer cette disparité. En effet, dans notre étude, le diamètre ovocytaire des grands follicules antraux était de 105 μm en moyenne (ZP exclue) alors qu'il est de 130 μm chez la femme (Gougeon, 1984) et de 117 μm chez la vache (Fair *et al.*, 1995). De même que pour le follicule, l'ovocyte de chatte semble donc débiter sa croissance à un diamètre relativement important, mais son diamètre maximal ne semble pas démesurément élevé. Ceci est bien représentée par le tableau 8, qui compare les diamètres ovocytaires et folliculaires à différents stades de la folliculogénèse chez la chatte à ceux de la chienne, espèce phylogénétiquement très proche.

TABLEAU 8 : Comparaison des diamètres folliculaires et ovocytaires (ZP exclue) chez la chienne (*d'après Songsasen et al., 2009 et Reynaud et al., 2009*) et la chatte au cours de la folliculogénèse.

Stade folliculaire	Chienne		Chatte	
	Follicule	Ovocyte	Follicule	Ovocyte
Primordial	25 µm	18 µm	44 µm	40 µm
Primaire	59 µm	31 µm	86 µm	64 µm
Pré-antral	131 µm	60 µm	155 µm	97 µm
Jeune antral	229 µm	84 µm	224 µm	108 µm
Pré-ovulatoire	6 000 µm	130 µm	3 600 µm	105 µm

3.2.FORMATION DE L'ANTRUM

La croissance des grands follicules est due d'une part à la prolifération des cellules folliculaires, et d'autre part à la formation et à l'augmentation de la taille de la cavité antrale. Dans certaines espèces, telles que les rongeurs, la composante cellulaire (ovocyte, cellules de la granulosa et cellules des thèques) représente la majeure partie du volume du follicule pré-ovulatoire. Chez d'autres espèces, dont le diamètre folliculaire moyen avant l'ovulation est supérieur à celui des rongeurs (femme, vache, chèvre, truie, vache), l'antrum constitue la plus grande partie du follicule pré-ovulatoire (Rodgers *et al.*, 2001). Pour ces espèces, la vitesse de croissance des follicules antraux ne dépend pas de la prolifération des cellules folliculaires, mais de la vitesse de croissance de l'antrum. Monniaux *et al.* (1994) ont montré que, chez la chèvre, le pourcentage de cellules de la granulosa en cours de multiplication diminue progressivement après la formation de l'antrum.

3.2.1. ROLES ET ORIGINE DE L'ANTRUM

L'apparition de l'antrum permet une croissance rapide du follicule. En outre, certains auteurs ont suggéré que la formation d'une cavité antrale était nécessaire au développement folliculaire et ovocytaire. En effet, la vascularisation de l'ovocyte est assurée par les capillaires sanguins de la thèque interne et de la thèque externe, mais les vaisseaux sanguins ne pénètrent pas la membrane basale. L'ovocyte et les cellules de la granulosa sont nourris par diffusion. Lors de la croissance folliculaire basale, l'ovocyte s'entoure progressivement de plusieurs couches de cellules de la granulosa. Redding *et al.* (2007) ont modélisé le transport de l'oxygène dans les follicules pré-antraux et antraux. D'après leurs estimations, l'oxygène peut facilement accéder jusqu'à l'ovocyte dans les petits follicules pré-antraux, mais sa diffusion est limitée dans les grands follicules pré-antraux. Les auteurs ont estimé que l'oxygène ne parvient plus en quantité suffisante jusqu'à l'ovocyte lorsque le follicule pré-antral atteint un diamètre compris entre 60 et 380 μm , ce qui correspond au diamètre d'apparition de l'antrum *in vivo* chez l'Homme. Le liquide folliculaire représente un milieu où l'oxygène n'est pas consommé et qui permet une diffusion plus facile des gaz sanguins qu'à travers les cellules de la granulosa.

La nutrition du follicule antral est également facilitée par une vascularisation accrue. Monteleone *et al.* (2008) ont montré qu'il existe une forte corrélation entre la concentration intra-folliculaire de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), synthétisé par les cellules de la granulosa et de la thèque, et le débit sanguin péri-folliculaire : plus la concentration en VEGF est élevée, plus le follicule est vascularisé. De même, Castilla *et al.* (2009) ont démontré que la prolactine contenue dans le liquide folliculaire stimule l'angiogenèse du follicule. D'autres facteurs tels que le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), l'angiopoïétine 1 et 2 et la thromboplastine, ont été identifiés comme étant des promoteurs locaux de la vascularisation folliculaire. La croissance folliculaire et ovocytaire est donc permise par l'augmentation des apports due à l'augmentation du débit sanguin péri-folliculaire, et par l'apparition de l'antrum qui facilite la diffusion des gaz sanguins et des nutriments.

Outre l'oxygène, le liquide folliculaire permet aussi une diffusion aisée des métabolites et des facteurs de régulation. L'antrum contient en effet un grand nombre de molécules dont, hormis les gaz respiratoires, des molécules inorganiques (sodium, potassium, magnésium, chlore, calcium, zinc, phosphate), des glucides (glucose, fructose, ribulose), des lipides (cholestérol, glycosaminoglycans), des protéines (albumine, globulines, enzymes, facteurs de croissance et

de régulation) et des hormones (œstradiol, progestérone, gonadotropines) (Edwards, 1974). L'antrum assure également la diffusion des facteurs de régulation du compartiment sanguin vers l'ovocyte et les cellules de la granulosa et *vice versa*. Les principales hormones contenues dans le liquide folliculaire des follicules en croissance sont les œstrogènes (Edwards, 1974). L'œstradiol, synthétisé par les cellules de la granulosa, est libéré dans la cavité antrale avant de rejoindre la circulation sanguine.

L'origine et les mécanismes conduisant à la formation du liquide antral n'ont pas clairement été élucidés. Sa concentration en molécules de petite taille (notamment les électrolytes) semble similaire aux concentrations sanguines. Par contre, l'analyse des concentrations intra-folliculaires en molécules de haut poids moléculaire (majoritairement des protéines) a montré des divergences entre le liquide folliculaire et le milieu sanguin (Edwards, 1974). La membrane basale, qui sépare les cellules de la granulosa des thèques, semble agir comme une interface sélective. Les concentrations relatives en molécules de haut poids moléculaire (> 100 kDa) dépendent de la taille des molécules : elles décroissent lorsque leur poids moléculaire augmente (Shalgi *et al.*, 1973). Ces résultats semblent indiquer que le liquide folliculaire est issu, au moins en partie, de la diffusion des molécules plasmatiques. Cependant, ils n'expliquent pas par quels mécanismes ces molécules sont attirées vers la cavité antrale. Clarke *et al.* (2006) ont montré que la présence de molécules de haut poids moléculaire et chargées négativement (glycosaminoglycans et protéoglycans) dans la cavité antrale contribuait significativement à augmenter le potentiel osmotique du liquide folliculaire chez les bovins. Compte-tenu de la taille de ces molécules, une origine extra-folliculaire est exclue. Ils ont donc suggéré que la formation de l'antrum était initiée par la sécrétion folliculaire de molécules capables de créer un gradient osmotique entre les milieux intra et extra-folliculaires, et entraînant l'entrée de molécules plasmatiques dans la cavité antrale. Néanmoins, ces considérations ne permettent pas d'expliquer à elles seules les réarrangements morphologiques observés lors de la formation de l'antrum. En effet, l'apparition de la cavité antrale est accompagnée d'une réorganisation des cellules de la granulosa en cellules murales (entourant l'antrum), en cellules du *cumulus oophorus* (liant l'ovocyte à la paroi folliculaire), et en cellules de la *corona radiata*, directement en contact avec l'ovocyte (Diaz *et al.*, 2007). Cette réorganisation morphologique et fonctionnelle permet une spécialisation cellulaire concernant les fonctions endocrines et paracrines.

Gore-Langton et Daniel (1990) ont étudié la réorganisation des cellules folliculaires issues de follicules pré-antraux de ratte en présence de certains facteurs de croissance. Même en

l'absence de possibilité de création d'une vraie cavité antrale remplie de liquide, les cellules de la granulosa étaient capables de s'organiser de façon similaire aux follicules antraux lors de l'ajout de FSH dans le milieu de culture. Ils ont donc émis l'hypothèse que la formation de l'antrum était initiée par la FSH, qui permet le réarrangement folliculaire, et que l'augmentation de la pression osmotique n'était qu'un mécanisme secondaire dans l'apparition de la cavité antrale. L'importance de la FSH dans la formation de l'antrum est aujourd'hui clairement établie, bien que ses cibles et ses mécanismes d'action ne soient pas totalement élucidés.

Des expériences d'ovocytectomie (Diaz *et al.*, 2007) ont montré que, outre la présence de FSH, l'ovocyte joue également un rôle majeur dans l'organisation des cellules du *cumulus oophorus* lors de la formation de l'antrum.

La formation de l'antrum est donc un mécanisme complexe qui fait intervenir des facteurs intra et extra-ovariens.

3.2.2. APPARITION DE L'ANTRUM LORS DE LA FOLLICULOGENESE

Dans notre étude, le plus petit follicule antral mesurait 164 μm , et le diamètre du plus grand follicule pré-antral était de 206 μm . Il apparaît donc que la formation de l'antrum a lieu pour un diamètre folliculaire compris entre 160 et 200 μm en moyenne dans l'espèce féline.

L'analyse de la croissance ovocytaire en fonction du stade folliculaire a montré que la croissance des follicules pré-antraux était plus rapide que la croissance des follicules après la formation de l'antrum, et que leur croissance respective pouvait être représentée par une relation linéaire. D'après ce modèle, l'antrum se forme lorsque le follicule atteint un diamètre de 160 μm , et l'ovocyte de 102 μm . Cette estimation est en accord avec nos observations.

Ce diamètre folliculaire seuil est légèrement inférieur à ceux déterminés par les précédentes études menées chez le chat. En effet, Jewgenow et Pitra (1993) ont montré que, lors du développement folliculaire *in vitro*, l'antrum se formait lorsque le follicule atteignait une taille de 220 à 280 μm . De même, dans l'étude menée par Bristol-Gould et Woodruff (2006) sur des coupes histologiques d'ovaires de chattes, les plus petits follicules antraux mesuraient 300 μm .

Toutefois, cette valeur est comparable à celles déterminées chez d'autres espèces. Gosden et Telfer (1987b) ont étudié le développement folliculaire chez 22 espèces de mammifères et ont déterminé que le diamètre folliculaire moyen lors de la formation de l'antrum variait de 200 à 400 μm (tableau 9).

TABLEAU 9 : Comparaison des diamètres folliculaires lors de la formation de l'antrum chez 8 espèces de mammifères (chèvre, chatte, souris, marsupiaux, femme, vache, truie, ouistiti).

Espèce	Diamètre folliculaire lors de la formation de l'antrum	Références
Chèvre	100-200 μm	<i>de Smedt et al. (1994)</i>
Chatte	160 μm	<i>(cette étude)</i>
Souris	187 μm	<i>Griffin et al. (2006)</i>
Marsupiaux	160-220 μm	<i>Rodger et al. (1992)</i>
Femme	180-240 μm	<i>Gougeon (1984)</i>
Vache	250 μm	<i>Braw-Tal et Yossefi (1997)</i>
Truie	350-400 μm	<i>Motlik et Fulka (1986), Mao et al. (2002)</i>
Ouistiti	470-500 μm	<i>Gilchrist et al. (1995)</i>

Certains auteurs ont comparé le diamètre folliculaire lors de la formation de l'antrum au diamètre pré-ovulatoire. Ainsi, chez la femme et la vache, l'antrum apparaît lorsque le follicule a atteint 2 % de son diamètre pré-ovulatoire (Motlik et Fulka, 1986 ; Greenwald et Terranova, 1988), 3 % chez le singe rhésus (Greenwald et Terranova, 1988), 4,5 % chez la truie (Motlik et Fulka, 1986) et 15 % chez le ouistiti (Gilchrist *et al.*, 1995). Dans notre étude, si l'on considère que le diamètre du follicule à l'apparition de l'antrum est de 160 à 200 μm et que le diamètre folliculaire pré-ovulatoire est de 3 600 μm (ce qui correspond au plus grand follicule observé), la formation de l'antrum a lieu lorsque le follicule a atteint 5 % de son diamètre pré-ovulatoire.

3.2.3. RELATION ENTRE LA FORMATION DE L'ANTRUM ET L'ACQUISITION DE LA COMPÉTENCE MÉIOTIQUE

La compétence méiotique est l'aptitude, pour l'ovocyte, à atteindre le stade métaphase II de la méiose. Iwanatsu et Yanagimachi (1975) ont remarqué que la formation de l'antrum

coïncidait avec l'aptitude pour l'ovocyte à reprendre la méiose chez le hamster. Ces observations ont ensuite été confirmées chez d'autres espèces de rongeurs telles que la souris (Sorensen et Wassarman, 1976), et le rat (Bar-Ami et Tsafiriri, 1981). Cette relation ne semble pourtant pas exister chez tous les mammifères. Ainsi chez la truie, seuls 17,3 % des ovocytes sont capables d'atteindre le stade métaphase II lors de la formation de l'antrum (Motlik et Fulka, 1986). Chez la vache, la compétence méiotique est acquise lorsque l'ovocyte atteint un diamètre de 115 μm (Marchal *et al.*, 2002), ce qui correspond à un diamètre folliculaire de 3 à 4 mm, alors que l'antrum se forme chez des follicules de 250 μm environ (Braw-Tal et Yossefi, 1997). De même, chez la chèvre, l'ovocyte est capable de reprendre sa méiose pour un diamètre folliculaire de 3 mm, alors que l'antrum apparaît entre 0,1 et 0,2 mm (de Smedt *et al.*, 1994).

Les études menées chez les primates indiquent également que, contrairement aux rongeurs, la formation de l'antrum ne coïncide pas avec l'acquisition de la compétence méiotique. Chez l'Homme, seuls 8,8 % de petits follicules antraux de 3 à 4 mm de diamètre contiennent des ovocytes capables de poursuivre leur division méiotique (Tsuji *et al.*, 1985). Chez le singe rhésus, 14 % des ovocytes sont méiotiquement compétents lors de la formation de l'antrum (Schramm *et al.*, 1993). Le ouistiti semble être une exception chez les primates : la compétence méiotique est acquise dès les petits follicules antraux (Gilchrist *et al.*, 1995). Néanmoins, dans cette espèce, l'antrum apparaît tardivement comparativement aux autres primates, lorsque le follicule mesure 15 % de son diamètre pré-ovulatoire, contre 2 % chez l'Homme.

Chez la chatte, le diamètre exact de l'ovocyte ou du follicule lors de l'acquisition de la compétence méiotique reste à déterminer. Comizzoli *et al.* (2003) ont montré que 78 à 83 % des ovocytes issus de follicules mesurant moins de 1 mm récoltés par micro-dissection de l'ovaire hors saison de reproduction étaient aptes à reprendre leur méiose *in vitro*.

Dans l'étude menée par Otoi *et al.* (2001), environ 65 % des ovocytes de 83,5 à 126,4 μm étaient capables d'atteindre le stade métaphase II de méiose *in vitro*, mais les auteurs n'ont pas remarqué de différence significative entre les différentes classes de follicules (< 100 μm , 100-110 μm , 110-120 μm et > 120 μm). Ces résultats suggèrent que l'aptitude à poursuivre la méiose est probablement acquise pour un diamètre ovocytaire inférieur à 100 μm , ZP exclue, ce qui correspond à un diamètre d'environ 110 μm en incluant la ZP. Dans notre étude, les ovocytes issus des jeunes follicules antraux (200 à 300 μm) mesuraient en moyenne $108,1 \pm$

1,6 μm , ZP incluse. L'acquisition de la compétence méiotique se produit donc probablement peu après la formation de l'antrum.

3.3.RELATION ENTRE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE ET OVOCYTAIRE

Lors des premiers stades de la folliculogenèse, l'étude des diamètres folliculaires et ovocytaires en relation avec le stade folliculaire a montré qu'il existait une disproportion entre la croissance du follicule et celle de l'ovocyte. En effet, l'ovocyte félin représentait 91,4 % du diamètre total du follicule primordial, alors qu'il ne représentait que 48,3 % du diamètre du jeune follicule antral. Juste avant l'ovulation, seuls 3,2 % de la largeur maximale du follicule étaient représentés par l'ovocyte. Ce déséquilibre est plus flagrant encore lorsque l'on considère le volume. Ainsi, l'ovocyte représente 76 % du volume du follicule primordial mais seulement 0,003 % du volume du follicule pré-ovulatoire.

3.3.1. CROISSANCE BIPHASIQUE DE L'OVOCYTE

Lorsque nous avons analysé la croissance ovocytaire en fonction de la croissance du follicule du stade primordial à jeune antral, nous avons remarqué que la croissance de l'ovocyte était ralentie après la formation de l'antrum. Nous avons donc choisi d'étudier cette croissance chez un plus grand nombre de follicules, et en incluant les follicules de grande taille. L'étude a porté sur 832 follicules, représentant tous les stades folliculaires jusqu'au follicule pré-ovulatoire.

Dans notre étude, la croissance de l'ovocyte se divise clairement en deux phases : une phase de croissance rapide et parallèle de l'ovocyte et du follicule, et une phase où la croissance de l'ovocyte est quasiment nulle alors que celle du follicule se poursuit de façon très intense. Cette croissance biphasique a déjà été démontrée chez la souris (Brambell, 1928), le hamster (Iwanatsu et Yanagimachi, 1975), la vache (Fair *et al.*, 1995 ; Wandji *et al.*, 1996), les marsupiaux (Rodger *et al.*, 1992) et la chienne (Songsasen *et al.*, 2009). Chez l'Homme, Gougeon (1984) a démontré que l'ovocyte suivait une croissance triphasique, l'ovocyte croissant de plus en plus lentement.

Lors de la première phase de la croissance ovocytaire, l'ovocyte félin suivait la relation linéaire suivante : $y = 0,500x + 20,01$, ce qui signifie qu'en moyenne, l'ovocyte croît deux fois moins vite que le follicule au cours de la première phase de croissance de l'ovocyte. Chez la souris, le même coefficient directeur a été déterminé ($y = 0,502x + 5,795$, Brambell, 1928). Par contre, chez la chèvre, le diamètre des ovocytes issus des follicules pré-antraux augmente plus lentement ($y = 0,32x + 17,9$, Cognie *et al.*, 1998).

Lors de la seconde phase de la croissance ovocytaire, l'ovocyte félin ne croît quasiment plus ($y = 0,001x + 114,39$). L'intersection des deux courbes obtenues a lieu pour un diamètre folliculaire de 189,1 μm et un diamètre ovocytaire de 114,6 μm . Cela signifie qu'à partir de ces diamètres, l'ovocyte a atteint sa taille maximale. En effet, dans notre étude, les plus grands follicules de plus de 2 500 μm contenaient un ovocyte de 115 μm en moyenne, ZP comprise, soit 105 μm environ ZP exclue. Chez la souris, le hamster, la chienne, la femme et la vache, le diamètre maximal de l'ovocyte est atteint pour des diamètres folliculaires respectivement de 125 μm (Brambell, 1928), 150 μm (Iwanatsu et Yanagimachi, 1975), 230 μm (Songsasen *et al.*, 2009), 300 μm (Gougeon, 1984) et 3 mm (Fair, 2003). Le tableau 10 résume les diamètres maximaux des ovocytes et les diamètres folliculaires auxquels les ovocytes atteignent ce diamètre chez la souris, le hamster, la chienne, la chatte, la femme et la vache.

Néanmoins, chez les marsupiaux, après une phase de croissance presque nulle telle qu'elle l'a été décrite chez les espèces précédentes, la taille de l'ovocyte augmente rapidement juste avant l'ovulation (Rodger *et al.*, 1992). Cette croissance tardive pourrait être corrélée à la formation des granules corticaux de l'ovocyte, qui apparaissent tardivement chez les marsupiaux.

Nous avons modélisé la croissance ovocytaire à partir de deux régressions linéaires. Griffin *et al.* (2006) ont utilisé des régressions polynomiales de type $y = ax^2 + bx + c$ pour décrire la croissance de l'ovocyte en fonction de la taille du follicule des stades primordial à grand antral chez la souris, le hamster, la truie et la femme. Ils ont montré que les courbes obtenues étaient similaires entre espèces mais pas tout à fait identiques.

TABLEAU 10 : Comparaison des diamètres ovocytaires maximaux et des diamètres folliculaires pour lesquels l’ovocyte atteint sa taille maximale chez 6 espèces de mammifères (souris, hamster, chatte, chienne, femme et vache).

Le diamètre ovocytaire maximal représente la taille de l’ovocyte juste avant l’ovulation (ZP exclue). A côté sont précisés les diamètres folliculaires à partir desquels les ovocytes ont atteint leur taille maximale. Pour rappels les diamètres folliculaires au moment de l’ovulation sont indiqués entre parenthèses (d’après Monniaux *et al.*, 1997).

Espèce	Diamètre ovocytaire max.	Diamètre folliculaire	Référence
Souris	70 µm	125 µm (0,6-0,8 mm)	<i>Brambell (1928)</i>
Hamster	80 µm	150 µm (0,6-0,8 mm)	<i>Iwanatsu et Yanagimachi (1975)</i>
Chatte	105 µm	190 µm (3 mm)	<i>(cette étude)</i>
Chienne	130 µm	230 µm (6 mm)	<i>Reynaud et al. (2009), Songsasen et al. (2009)</i>
Femme	130 µm	300 µm (20 mm)	<i>Gougeon (1984)</i>
Vache	117 µm	3000 µm (10-20 mm)	<i>Fair et al. (1995), Fair (2003)</i>

3.3.2. RELATION ENTRE L’ACQUISITION DU DIAMETRE OVOCYTAIRE MAXIMAL ET LA FORMATION DE L’ANTRUM

Chez les rongeurs (souris : Brambell, 1928 ; hamster : Iwanatsu et Yanagimachi, 1975), les marsupiaux (Rodger *et al.*, 1992) et la chienne (Songsasen *et al.*, 2009), l’ovocyte atteint son diamètre maximal de façon concomitante avec la formation de l’antrum. Ceci ne semble pas être le cas chez toutes les espèces. Par exemple chez la truie (Motlik et Fulka, 1986 ; Mao *et al.*, 2002), la vache (Motlik et Fulka, 1986) et la chèvre (de Smedt *et al.*, 1994), la taille de l’ovocyte augmente encore après la formation de l’antrum.

Dans notre étude, le diamètre maximal de l’ovocyte félin était acquis peu après la formation de l’antrum mais ces deux événements n’étaient pas strictement simultanés. En effet, nous avons déterminé que l’apparition de l’antrum se produisait pour un diamètre folliculaire de 160 µm, alors que l’ovocyte rejoint sa taille maximale lorsque le follicule mesure environ 190 µm. Néanmoins, lors de la formation de l’antrum, l’ovocyte avait atteint 90 % de son diamètre

maximal, ce qui représente plus de 70 % de son volume maximal. De même, chez les espèces dont le diamètre ovocytaire maximal n'est pas atteint au moment de la formation de l'antrum, telles que la vache et la truie chez lesquelles l'ovocyte n'a atteint que 80 % environ de son diamètre maximal au moment de la formation de l'antrum, cet événement se produit peu après.

Dans l'étude de la première phase de croissance ovocytaire, nous avons inclus tous les follicules de moins de 200 µm de diamètre. Nous avons défini arbitrairement cette limite puisque tous les follicules observés de plus de 206 µm comportaient une cavité antrale. Cependant, nous avons observé que certains follicules présentaient un antrum dès 164 µm de diamètre. La relation décrite fait donc référence à la croissance des petits follicules, mais elle ne permet pas d'étudier spécifiquement la croissance des follicules pré-antraux. Cette dernière a été étudiée lors de la première partie de l'étude, pour laquelle le stade du follicule étudié était systématiquement précisé. Chez les follicules pré-antraux, la relation déterminée est similaire mais n'est pas tout à fait équivalente ($y = 0,526x + 17,68$).

3.3.3. RELATION ENTRE LE DIAMETRE OVOCYTAIRE ET L'ACQUISITION DE LA COMPETENCE MEÏOTIQUE

L'acquisition de la compétence méiotique et la formation de l'antrum se produisent de façon concomitante dans certaines espèces mais pas systématiquement (voir plus haut). Il semble intéressant de remarquer que chez la souris et le hamster (chez lesquels l'ovocyte est capable de reprendre la méiose dès l'apparition de l'antrum), le diamètre maximal de l'ovocyte est atteint lors de la formation de l'antrum, tandis que chez la truie, la vache et l'Homme (pour lesquels l'aptitude à reprendre la méiose n'est pas encore acquise lors de la formation de l'antrum), l'ovocyte acquiert sa taille maximale plus tardivement. L'acquisition de la compétence méiotique ne se produirait donc que lorsque l'ovocyte a atteint son diamètre maximal, indépendamment du moment de formation de l'antrum (de Smedt *et al.*, 1994). A titre d'exemple, chez la vache, l'ovocyte est méiotiquement compétent lorsqu'il atteint la taille de 115 µm (Otoi *et al.*, 1997), ce qui est très proche de son diamètre maximal (117 µm, Fair *et al.*, 1995).

Cette notion a néanmoins été nuancée. Chez la truie (Tsafiriri et Channing, 1975), la femme (Tsuji *et al.*, 1985), la chèvre (de Smedt *et al.*, 1994) et la vache (Marchal *et al.*,

2002), l'aptitude à reprendre la méiose est acquise de façon progressive au cours de la croissance folliculaire. Ainsi, plus le diamètre folliculaire augmente, plus la proportion d'ovocytes capables d'atteindre le stade métaphase II de méiose s'accroît.

Ainsi, bien que le diamètre de l'ovocyte ne varie plus, la compétence méiotique n'est pas nécessairement acquise dès que l'ovocyte a atteint son diamètre maximal (Schramm *et al.*, 1993).

3.4. APPARITION ET EVOLUTION DE L'ÉPAISSEUR DE LA ZONE PELLUCIDE

La zone pellucide, membrane acellulaire qui entoure l'ovocyte, possède plusieurs fonctions importantes pour l'ovogenèse, la fécondation et le développement pré-implantatoire de l'embryon.

3.4.1. COMPOSITION ET STRUCTURE DE LA ZONE PELLUCIDE

Bleil et Wassarman (1980a) ont été les premiers à décrire la composition de la ZP. Chez la souris, plus de 80 % du poids sec de la ZP est constituée de protéines. Ils ont identifié trois glycoprotéines spécifiques, qu'ils ont nommées ZP1, ZP2 et ZP3 selon leur poids moléculaire, ZP3 étant la plus petite. ZP2 et ZP3 sont des monomères alors que ZP1 est un homodimère, composé de deux sous-unités identiques unies par des ponts disulfures. Chacune de ces protéines est formée par un seul peptide qui possède plusieurs sites de glycosylation en régions proximale et distale (Green, 1997). Chez les autres mammifères, la ZP est également majoritairement constituée de trois (chez la chienne, la chatte, la vache, la truie et la lapine par exemple) ou quatre (chez la femme, la ratte et les primates par exemple) glycoprotéines. Chez les vertébrés, il existe 6 sous-familles de glycoprotéines de ZP, chaque espèce possédant des protéines appartenant à 3 à 6 des ces sous-familles. Goudet *et al.* (2008) ont montré que, pour chaque famille de glycoprotéines, ces protéines possédaient des domaines très conservés d'une espèce à l'autre en région C-terminale, dérivant de gènes ancestraux communs.

Ces protéines sont organisées de façon particulière. Chez la souris, la ZP est constituée de filaments formés par une répétition d'hétérodimères de ZP2 et ZP3, et unis par des homodimères de ZP1 (Greve et Wassarman, 1985). Cette structure semble toutefois variable

selon les espèces : chez l'Homme, ZP2 forme des homodimères et chez la truie, il n'y a pas de site de sulfuration sur ZP1 et ZP3 (Green, 1997).

L'apparition de la microscopie électronique à transmission a permis de préciser l'aspect morphologique de la ZP. Dans l'espèce féline, Lunn et Wright (2009) ont montré que la ZP apparaît sous la forme d'une structure spongieuse, formée de plusieurs épaisseurs fibreuses, percées de pores de 1 à 2 µm de diamètre en surface et recevant des projections cellulaires de 1 µm de diamètre issues des cellules de la granulosa du *cumulus oophorus*. Cette organisation semble varier légèrement d'une espèce à l'autre (taille et nombre de pores, rugosité...) (Mugnier *et al.*, 2009).

3.4.2. ROLES DE LA ZONE PELLUCIDE

La ZP remplit plusieurs fonctions indispensables au développement et à la maturation de l'ovocyte et du follicule, à la fécondation et au développement embryonnaire précoce. Son rôle dans le développement folliculaire a longtemps été négligé. Bien qu'il soit incomplètement élucidé, il a récemment été précisé. De par sa position, la ZP joue un rôle majeur dans les échanges paracrines entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa. Lors d'expériences de mutagenèse chez la souris, Rankin *et al.* (1999) ont décrit la présence de cellules ectopiques entre l'ovocyte et la ZP chez les souris dont le gène codant pour ZP3 avait été invalidé ($ZP3^{-/-}$). De plus, certains grands follicules possédaient un espace périvitellin (formé par l'espace entre l'ovocyte et la ZP après l'émission du premier globule polaire) plus large que chez les souris sauvages. De même, chez les souris invalidées pour le gène ZP2 ($ZP2^{-/-}$), le *cumulus oophorus* est désorganisé. Les souris $ZP1^{-/-}$, $ZP2^{-/-}$ ou $ZP3^{-/-}$ possèdent moins de follicules antraux que les souris sauvages, et que chez les souris $ZP2^{-/-}$, le nombre total d'ovocytes récoltés dans l'oviducte après stimulation hormonale est réduit (Rankin *et al.*, 2001).

La ZP joue également un rôle fondamental lors de la fécondation. Elle permet tout d'abord la reconnaissance spécifique du spermatozoïde par l'ovocyte. Ainsi, après extraction et purification des trois glycoprotéines de ZP chez la souris, Bleil et Wassarman (1980b) ont montré que seule ZP3 possède la capacité de se fixer au spermatozoïde, et l'ont qualifiée de « *sperm-receptor* ». Florman et Wassarman (1985) ont ensuite démontré que le « retrait » de la partie oligosaccharidique située en région proximale de ZP3 inhibait la fixation du spermatozoïde. D'autres études ont ensuite montré que cette fixation n'était pas altérée par un traitement préalable de ZP3 par les hautes températures, les détergents, les agents dénaturants,

les agents réducteurs ou une protéolyse limitée (Wassarman *et al.*, 1999). La fixation du spermatozoïde n'est donc pas liée à la partie peptidique de ZP3 mais à sa partie glycosylée. Plus tard, l'étude de la séquence polypeptidique de ZP3 a mis en évidence l'existence d'une grande variation interspécifique (contrairement à ZP1 et ZP2, dont les séquences sont relativement conservées d'une espèce à l'autre). ZP3 semble donc jouer un rôle prédominant dans la restriction spécifique lors de la fécondation : les spermatozoïdes d'une espèce ne sont pas reconnus par la ZP d'une espèce différente, et ne peuvent donc pas se fixer sur l'ovocyte (Wassarman et Litscher, 2008). Cette notion doit toutefois être nuancée : certaines espèces semblent plus permissives que d'autres quant à la reconnaissance et à fixation des spermatozoïdes d'une espèce différente. Il semble donc que d'autres mécanismes interviennent dans la restriction spécifique du spermatozoïde (Mugnier *et al.*, 2009).

La ZP permet aussi l'initiation de la réaction acrosomique. L'acrosome est une large vésicule sécrétoire qui recouvre le noyau du spermatozoïde dans sa région apicale. Lors de la fixation du spermatozoïde sur l'ovocyte, la fusion de la membrane de l'acrosome avec celle du spermatozoïde permet l'exposition de la face interne de la membrane de la vésicule. Seuls les spermatozoïdes qui ont réalisé cette succession d'événements ont la capacité de féconder l'ovocyte. Bleil et Wassarman (1983) ont démontré que ZP3 est responsable de l'initiation de ce phénomène. La réaction acrosomique fait ensuite intervenir plusieurs messagers secondaires, dont la protéine G, la phospholipase C, l'inositol tri-phosphate, des canaux calciques voltage-dépendants et le calcium (Wassarman et Litscher, 2008). Alors que la partie peptidique de ZP3 n'était pas impliquée dans la fixation du spermatozoïde à la ZP chez la souris, elle est indispensable au déroulement de la réaction acrosomique (Florman *et al.*, 1984).

En outre, la ZP est responsable de l'inhibition de la polyspermie. La fécondation provoque l'exocytose des granules corticaux de l'ovocyte, c'est la réaction corticale. Diverses substances capables de modifier les glycoprotéines sont alors libérées dans la ZP. En particulier, une glucosidase contenue dans les granules corticaux de l'ovocyte est responsable de la modification de ZP3 (Miller *et al.*, 1993). Cette protéine modifiée après la fécondation a été nommée ZP3_f et ne se fixe plus au spermatozoïde (Bleil et Wassarman, 1983). De la même façon, la protéolyse de ZP2 en ZP2_f par une protéase des granules corticaux (la « ZP2-protéinase » ; Moller et Wassarman, 1989) est responsable de la modification des propriétés biochimiques et biologiques de la ZP après la fécondation, communément appelée « durcissement » de la ZP. Il s'agit en réalité d'un accroissement de la résistance de la ZP (Bleil *et al.*, 1981).

La ZP permet enfin la protection du jeune embryon au cours du développement embryonnaire précoce. Lors de l'ovulation, l'ovocyte expulsé est entouré de sa ZP. Chez les souris *ZP3^{-/-}*, les ovocytes sont totalement dépourvus de ZP (Liu *et al.*, 1996). Il a néanmoins été observé la présence de follicules pré-ovulatoires. Après stimulation hormonale, il est possible de récolter des ovocytes dans l'oviducte, mais aucune de ces souris adultes n'a été gestante après insémination naturelle. Plus tard, Rankin *et al.* (2001) ont montré que, après fécondation *in vitro*, les souris *ZP1^{-/-}* produisent autant d'embryons au stade deux cellules que les souris sauvages (75 % et 81 % respectivement). Par contre, chez les souris *ZP2^{-/-}*, seuls 50 % des ovocytes forment des embryons au stade deux cellules, de même que chez les souris *ZP3^{-/-}* (53 %). Ces souris produisent également moins de blastocystes et, après transfert des embryons, aucune naissance n'a été observée.

La ZP est donc un élément crucial dans le développement folliculaire et la fertilité. Cependant, la plupart des mécanismes précis de ses fonctions demeurent mal connus et demandent à être élucidés. De plus, beaucoup d'études ont été menées chez la souris alors qu'il semble exister une grande variabilité interspécifique. D'autres études sont donc nécessaires pour préciser les rôles de la ZP chez le chat.

3.4.3. APPARITION DE LA ZONE PELLUCIDE LORS DE LA FOLLICULOGENESE ET ORIGINE

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de ZP dans les follicules primordiaux et primaires. Ces résultats sont en accord avec ceux de Jewgenow et Fickel (1999) qui ont montré que seuls 30 % des follicules primaires de chatte présentaient seulement des fragments de ZP qui ne recouvraient pas la totalité de l'ovocyte, de même que Jewgenow et Rudolph (2001) qui ont également observé des fragments de ZP chez les follicules primaires, mais pas de ZP complète.

Par contre, Barber *et al.* (2001) ont décrit chez la chatte la présence d'une ZP chez tous les follicules primaires. Ils ont également observé une ZP réellement formée dès le stade primaire chez la chienne, la jument et la femelle éléphant. Dans cette étude, la ZP mesurait $4,4 \pm 2,4$ μm dans les follicules primaires de chatte.

L'origine de la ZP demeure à ce jour une source de controverses. Il a été suggéré que la ZP pouvait être synthétisée soit par l'ovocyte, soit par les cellules de la granulosa, soit par les deux conjointement.

Bleil et Wassarman (1980c) ont été les premiers à préciser l'origine de la ZP chez la souris. Ils ont collecté des follicules chez des souris âgées de 8 à 15 jours, et les ont dénudés de leur

zone pellucide. Les ovocytes dénudés et les follicules entiers ont ensuite été cultivés dans un milieu contenant des précurseurs des protéines de la ZP marqués radioactivement. Le taux d'incorporation de la radioactivité était équivalent chez les ovocytes seuls et chez les follicules entiers, indiquant donc que, chez la souris, l'ovocyte seul est capable de synthétiser la ZP. Il n'est toutefois pas exclu que les cellules de la granulosa puissent également synthétiser ces glycoprotéines. Chez la souris, la protéine appelée OSP-1, synthétisée par l'ovocyte, joue le rôle de facteur de transcription capable d'activer un promoteur spécifique de ZP3 (Schickler *et al.*, 1992).

Chez la souris, les protéines de la ZP sont synthétisées dans un ordre précis : ZP2 est synthétisée dès le stade primordial, alors que ZP1 et ZP3 ne sont présentes que dans les follicules en croissance (Epifano *et al.*, 1995). L'expression séquentielle des protéines de la ZP a également été prouvée chez la chatte. Jewgenow et Fickel (1999) ont étudié la présence d'ARN de ZP dans l'ovocyte et la granulosa conjointement par RT-PCR : ZPB (ZP1) est synthétisé dans les follicules primordiaux et primaires, et ZPA (ZP2) et ZPC (ZP3) ne sont synthétisés que dans les stades ultérieurs. Ces résultats ont été confirmés par Jewgenow et Rudolph (2001) qui ont montré que, dans l'espèce féline, ZP1 est présente dans les follicules primaires alors que ZP2 et ZP3 apparaissent dans les follicules pré-antraux. L'ordre selon lequel les protéines de la ZP sont synthétisées semble varier selon les espèces mais l'expression séquentielle des protéines a été mise en évidence chez toutes les espèces étudiées.

Contrairement à la souris, l'origine exacte des glycoprotéines de la ZP chez les autres mammifères paraît plus complexe. Par exemple, Gook *et al.* (2008) ont montré que chez l'Homme, la ZP est synthétisée à la fois par l'ovocyte et les cellules de la granulosa.

Chez la chatte, l'origine exacte de la ZP n'a pas été déterminée. D'une part, Barber *et al.* (2001) ont utilisé des anticorps anti-ZP de porc (*pZP*) et ont remarqué qu'ils se fixaient dans le cytoplasme des ovocytes félines. Ils en ont déduit que chez le chat, la ZP est probablement synthétisée par l'ovocyte. Malheureusement, leurs préparations ne permettaient pas une conservation optimale de la structure cellulaire. D'autre part, Jewgenow et Rudolph (2001), qui ont utilisé des anticorps anti-ZP de chat (*fZP*) ont montré que les anticorps se fixaient à la fois aux ovocytes et aux cellules de la granulosa, suggérant une origine double.

3.4.4. DIMENSIONS DE LA ZONE PELLUCIDE CHEZ LA CHATTE

Nous avons évalué l'épaisseur de la ZP à $2,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ dans les follicules secondaires, et $3,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$ dans les follicules pré-antraux. Ceci est équivalent aux valeurs obtenues par Jewgenow et Rudolph (2001). Dans leur étude, les follicules secondaires et pré-antraux présentaient une ZP de $0,5$ à $3 \mu\text{m}$ d'épaisseur. En revanche, ces résultats sont très inférieurs à ceux de Barber *et al.* (2001) qui ont mesuré une épaisseur de $8,9 \pm 3,1 \mu\text{m}$ pour les follicules pré-antraux.

Les jeunes follicules antraux que nous avons étudiés possédaient une ZP de $3,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$, et les plus gros follicules antraux ($> 2500 \mu\text{m}$), une ZP de $5,9 \mu\text{m}$ en moyenne. Ces résultats sont toujours en adéquation avec ceux de Jewgenow et Rudolph (2001) (5 à $7 \mu\text{m}$ pour les follicules pré-ovulatoires). Ils sont toutefois nettement inférieurs à ceux de Barber *et al.* (2001), qui ont évalué l'épaisseur de la ZP à $14,2 \pm 4,0 \mu\text{m}$ chez les follicules pré-ovulatoires, et à ceux de Goodrowe *et al.* (1988), qui estiment l'épaisseur de la ZP à $17,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ pour les follicules pré-ovulatoires chez le chat.

Barber *et al.* (2001) ont également mesuré l'épaisseur de la ZP pour chaque stade folliculaire chez la chienne, la jument et l'éléphant. A titre de comparaison, ils ont observé des valeurs légèrement inférieures chez la chienne ($9,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$ chez la chienne contre $14,2 \pm 4,0 \mu\text{m}$ chez la chatte pour les follicules pré-ovulatoires par exemple).

En outre, nos observations ont révélé que tous les ovocytes inclus dans des follicules de diamètre inférieur à $90 \mu\text{m}$ étaient dépourvus de ZP, alors que tous les follicules de plus de $110 \mu\text{m}$ de diamètre possédaient une ZP. Le plus petit follicule chez lequel nous avons observé une ZP mesurait $93,8 \mu\text{m}$. A notre connaissance, aucun auteur n'a mis en relation l'épaisseur de la zone pellucide et le diamètre folliculaire dans l'espèce féline. Nous n'avons pas trouvé de relation entre l'épaisseur de la zone pellucide et le diamètre ovocytaire. Par contre, la croissance de la zone pellucide semble ralentie lorsque le follicule atteint une taille équivalente à celle où l'antrum apparaît, qui correspond également à un ralentissement de la croissance ovocytaire.

3.4.5. PERSPECTIVES

Actuellement, la ZP est particulièrement étudiée en raison du développement de l'immunocontraception. On désigne par immunocontraception toute technique qui utilise les

propres anticorps de l'organisme pour bloquer la fertilité. Les cibles visées par les anticorps qui ont été explorées sont la ZP, le spermatozoïde et les hormones sexuelles (particulièrement la GnRH) (Purswell et Kolster, 2006). Il existe deux types d'immunocontraception : la contraception réversible (inhibition de l'interaction ovocyte-spermatozoïde), et la contraception irréversible (destruction du stock de follicules ovariens). Le caractère réversible ou non dépend de la cible et de l'origine des protéines visées. La stérilité irréversible peut être une conséquence recherchée mais elle ne paraît pas souhaitable chez la femme ou les espèces menacées d'extinction.

Les protéines de ZP de porc ont souvent été utilisées en raison de leur facilité d'accès. Cependant, Jewgenow *et al.* (2000) ont montré qu'il n'y a pas de réactions croisées entre le porc et le chat, ce qui pourrait expliquer les résultats décevants et l'importance des doses nécessaires pour obtenir la stérilité chez la chatte en utilisant les protéines porcines. La réalisation de vaccins contenant des protéines de ZP porcine serait donc inefficace chez la chatte. Ringleb *et al.* (2004) ont montré que les anticorps anti-ZPB (ZP1) de chat inhibent la fixation des spermatozoïdes et la fécondation *in vitro*. Aucune étude n'a été menée *in vivo*.

D'après les premiers essais effectués chez d'autres espèces de mammifères, certaines réactions secondaires sont possibles, telles que des modifications du comportement ou une réaction inflammatoire de l'ovaire. Il apparaît que les anticorps visant des protéines qui apparaissent très tôt dans le développement folliculaire sont associés à des risques importants de pathologie ovarienne, tandis que les anticorps se liant à des protéines qui apparaissent plus tardivement ne perturbent pas la fonction ovarienne (Jewgenow *et al.*, 2000).

3.5. QUELQUES REMARQUES SUR LES FOLLICULES POLYOVOCYTAIRES

Bien que, dans la grande majorité des cas, les follicules ovariens soient constitués d'un seul follicule entouré de cellules folliculaires, nous avons observé plusieurs follicules contenant deux ou plusieurs ovocytes, appelés follicules polyovocytaires. Notre étude ne s'est pas attachée à la description systématique de ces follicules. Ils semblent cependant plus nombreux chez le chat que chez la plupart des autres mammifères.

Chez la chatte, certains auteurs ont rapporté la présence de follicules contenant jusqu'à 5 ovocytes (Kennedy, 1924 ; Dederer, 1934). A ma connaissance, il s'agit du nombre



maximal rapporté dans la littérature chez la chatte. Chez d'autres espèces, certains auteurs ont observé des follicules contenant un nombre d'ovocytes bien plus important. Ainsi, chez la chienne, Telfer et Gosden (1987) ont observé un follicule contenant 14 ovocytes, et Al-Mufti *et al.* (1988) ont observé jusqu'à 24 ovocytes dans le même follicule chez la lapine.

La fréquence des follicules polyovocytaires est très variable selon les espèces étudiées. Chez la chatte, Telfer et Gosden (1987) ont estimé leur fréquence à environ 4 % et Jewgenow (1999) a observé environ 10 % de follicules bi-ovocytaires chez des follicules pré-antraux de chatte. Cette fréquence semble relativement importante par rapport à celle observée chez la plupart des autres espèces de mammifères. Chez la femme, 0,1 à 2,4 % des follicules ovariens contiennent plus d'un ovocyte (Gougeon, 1981). Telfer et Gosden (1987) ont comparé plusieurs espèces et ont évalué la fréquence des follicules polyovocytaires chez la lapine, le singe rhésus, la femme et la chienne respectivement à 1 %, 2 %, 3 % et 14 %. Chez les autres mammifères qu'ils ont étudiés (dont la brebis la souris et la ratte), la présence de follicules polyovocytaires semble beaucoup plus rare (< 0,1 %). La chienne possède un nombre particulièrement élevé de tels follicules. Payan-Carreira et Pires (2008) ont même estimé leur fréquence à plus de 40 % en moyenne chez la chienne.

Outre l'espèce concernée, cette fréquence varie aussi selon que l'on considère les follicules contenant 2, 3 ou plus de 3 ovocytes. Chez la femme, Gougeon (1981) a rapporté que 97,1 % des follicules polyovocytaires contenaient 2 ovocytes, tandis que seuls 2,5 % des follicules polyovocytaires contenaient 3 ovocytes et 0,4 % plus de 3 ovocytes. Chez la chienne, le rapport entre le nombre de follicules polyovocytaires et le nombre total de follicules diminue de façon exponentielle lorsque le nombre d'ovocytes augmente (Telfer et Gosden, 1987).

Le nombre de follicules polyovocytaires semble également varier selon l'âge de l'animal. Il a souvent été rapporté que les follicules polyovocytaires étaient plus fréquents chez les jeunes animaux et les animaux pré-pubères. Un nombre important de follicules polyovocytaires a été rapporté chez le chaton (Shehata, 1974). Plus précisément, Telfer et Gosden (1987) ont montré que chez les chiennes âgées de 1 à 2 ans, 14 % des follicules contiennent plusieurs ovocytes, tandis que chez les chiennes de 7 à 11 ans, seuls 5 % des follicules sont polyovocytaires. Toujours chez la chienne, Payan-Carreira et Pires (2008) ont comparé la fréquence des follicules polyovocytaires chez des chiennes pré-pubères, de moins de 1 an, de 7 à 8 ans et de plus de 10 ans. Ils ont montré que cette fréquence diminue progressivement avec l'âge de l'animal (respectivement 68,4 %, 62,2 %, 30,4% et 14,3 %). Enfin, d'autres études menées chez la truie ont montré que la fréquence des follicules polyovocytaires est de

6,36 % chez la truie pré-pubère, et de seulement 1,38 % chez la truie mature (Stankiewicz *et al.*, 2009). D'autres auteurs n'ont, malgré une observation systématique, pas relevé de variation avec l'âge. Ainsi, Gougeon (1981) n'a pas observé de variation significative de la fréquence des follicules polyovocytaires avec l'âge chez des femmes âgées de 18 à 52 ans. De même, McDougall *et al.* (1997) n'a pas mis en évidence de variation du nombre total de follicules polyovocytaires chez 3 groupes de chiennes autour de la puberté (âgées de moins de 6 mois, de 6 à 10 mois et de plus de 10 mois).

Plusieurs auteurs se sont attachés à savoir si la morphologie de ces follicules était comparable à celle des follicules mono-ovocytaires. Tout d'abord, la taille des ovocytes semble présenter quelques particularités. Telfer et Gosden (1987) ont montré que chez la chienne, les ovocytes issus de follicules polyovocytaires débutent leur croissance à une taille équivalente à celle des follicules mono-ovocytaires, mais que, à partir du stade secondaire, la taille moyenne des ovocytes des follicules polyovocytaires est systématiquement inférieure à celle des ovocytes des follicules mono-ovocytaires au même stade de développement.

Plus que la taille moyenne des ovocytes, la taille entre les ovocytes au sein du même follicule semble souvent différer (Kennedy, 1924 ; Dederer, 1934). Stankiewicz *et al.* (2009) ont en effet montré qu'il existe une différence significative entre la taille moyenne du plus grand ovocyte ($141,8 \pm 6,2 \mu\text{m}$) et la taille moyenne du plus petit ovocyte ($117,6 \pm 7,0 \mu\text{m}$) chez les follicules biovocytaires de truie. Toujours chez la truie, Al-Mufti *et al.* (1988) se sont attachés à décrire les follicules polyovocytaires en fonction de leur stade de développement. Pour les ovocytes primaires, ils décrivent trois cas de figure : 2 petits ovocytes de même taille, 2 ovocytes de tailles différentes, ou 2 grands ovocytes de même taille. A partir du stade secondaire, ils remarquent qu'il y a toujours un ovocyte plus grand que le ou les autre(s), ce qui est en accord avec les observations de Ron-El *et al.* (1990). Enfin, ils montrent que, lorsque le follicule contient plus de 3 ovocytes, tous les ovocytes sont systématiquement plus petits que ceux des follicules mono-ovocytaires, quel que soit le stade folliculaire. Dans la même étude, ils montrent que, pour les follicules antraux, la taille de l'ovocyte dépend de sa position au sein du follicule. Ainsi, pour les follicules contenant 2 ou 3 ovocytes, la taille de l'ovocyte central est équivalente à celle des ovocytes de follicules mono-ovocytaires au même stade de développement, tandis que les ovocytes « muraux » sont plus petits.

La taille des follicules polyovocytaires semble également différente de celle des follicules mono-ovocytaires. Telfer et Gosden (1987) ont montré que chez la chienne, les follicules polyovocytaires ont une taille supérieure aux follicules mono-ovocytaires au même stade.

Cette différence serait liée à un volume ovocytaire total plus important et un nombre de cellules de la granulosa plus élevé.

Enfin, la morphologie du follicule polyovocytaire est particulière. Dans la plupart des cas, chaque ovocyte possède sa propre ZP, mais Ron-El *et al.* (1990) ont observé des follicules dans lesquels 2 ovocytes étaient entourés d'une même ZP. De plus, Dederer (1934) a rapporté que, dans les follicules antraux polyovocytaires, chaque ovocyte possède son propre cumulus. Cependant, Al-Mufti *et al.* (1988) indiquent que seuls les ovocytes centraux possèdent un *cumulus oophorus*, et Ron-El *et al.* (1990) ont montré que certains follicules contiennent deux cumulus adjacents, voire un seul cumulus contenant 2 ovocytes.

L'origine des follicules polyovocytaires demeure controversée et n'est toujours pas réellement élucidée. Dès les premières observations, diverses hypothèses ont été émises. Ainsi, selon Kennedy (1924), Schrottländer a d'abord émis l'hypothèse d'une erreur d'orientation des cellules folliculaires lors de la formation du follicule primordial. Puis, Stoeckel a suggéré que les ovocytes des follicules polyovocytaires étaient issus de la division d'une seule cellule à plusieurs noyaux elle-même formée par une erreur de mitose. Cette hypothèse semble toutefois peu crédible pour expliquer l'origine des follicules contenant un très grand nombre d'ovocytes. Loeb a en outre évoqué la possibilité d'une inclusion des plus petits follicules dans les grands follicules lors de la croissance de ces derniers. Cette dernière hypothèse paraît peu probable pour Telfer et Gosden (1987) puisqu'un tel événement n'a jamais été directement observé et compte-tenu du fait que l'incidence des follicules polyovocytaires diminue avec la taille de l'ovocyte alors que les plus gros follicules devraient au contraire comporter fréquemment plusieurs ovocytes. Enfin, d'après Al-Mufti *et al.* (1988), Hartman a évoqué la possibilité que de tels follicules soient formés à partir de groupes d'ovocytes unis par des ponts intercellulaires qui ne se séparent pas lors de la formation des follicules.

D'après la distribution des follicules en fonction du nombre d'ovocytes qu'ils contiennent, Gosden et Telfer (1987) ont montré qu'il s'agit plus probablement d'un phénomène aléatoire que d'un phénomène pathologique.

L'hypothèse la plus fréquemment avancée pour expliquer la diminution de la fréquence des follicules polyovocytaires après la puberté est la modification de l'équilibre hormonal. Iguchi *et al.* (1990) ont étudié l'effet du diéthylstilbestrol (DES), un analogue des œstrogènes, sur la fréquence des follicules polyovocytaires. Les souris traitées au DES présentaient 47 fois plus de follicules polyovocytaires (28 %) que le groupe témoin (0,6 %). Les mêmes résultats ont

été observés après une greffe des ovaires chez des souris ne recevant aucun traitement œstrogénique, et sur des ovaires excisés dès la naissance et cultivés 5 jours dans un milieu contenant du DES, ce qui suppose une action directe des œstrogènes. En outre, les souris traitées au DES qui ont reçu de l'eCG (*equine Chorionic Gonadotropin*) à action FSH, et de l'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*) à action LH, avaient moins de follicules polyovocytaires que les souris ayant reçu du DES uniquement, ce qui suggère un rôle des gonadotropines. Néanmoins, ces études ont été conduites sur des souriceaux nouveau-nés. Gougeon (1981) n'a en revanche trouvé aucune différence dans la fréquence des follicules polyovocytaires chez des femmes âgées de 18 à 52 ans en fonction du délai post-partum, de la présence ou non d'une contraception orale, de traitements en vue d'induire l'ovulation ou du jour du cycle ovarien.

D'abord appelés « follicules polyovulatoires », des doutes ont été émis concernant la faculté des follicules polyovocytaires à se développer normalement et à atteindre l'ovulation. Kennedy (1924) n'a observé aucune figure de mitose dans les follicules polyovocytaires de chienne, de chatte, de lapine, de pouliche ou de cochon d'Inde. De même, Gougeon (1981) n'a relevé qu'un seul follicule pré-antral à l'aspect viable sur 64 follicules polyovocytaires secondaires et pré-antraux de femme. Pourtant, la proportion de grands follicules antraux est identique chez les follicules polyovocytaires et mono-ovocytaires (Gougeon, 1981 ; Al-Mufti *et al.*, 1988), ce qui indique que ces follicules ne sont pas plus prédisposés à l'atrésie. Al-Mufti *et al.* (1988) ont montré que chez la lapine, les follicules contenant 2 ou 3 ovocytes peuvent atteindre tous les stades de la folliculogénèse, jusqu'au stade pré-ovulatoire. Ils indiquent que, au sein d'un même follicule, tous les ovocytes ne peuvent achever leur croissance mais qu'il existe toujours un ovocyte dont la taille est suffisante pour achever la méiose. Cependant, compte-tenu de leur taille plus importante, il suppose que de tels follicules mettent un délai plus important à rejoindre leur taille maximale, ce qui réduit probablement leurs chances d'être sélectionnés au cours d'une vague folliculaire. Pourtant, lors de l'étude de l'ovulation chez la chienne, certains auteurs ont constaté que le nombre d'ovocytes collectés dans l'oviducte après l'ovulation était parfois supérieur au nombre de corps jaunes observés sur l'ovaire correspondant (Bysted *et al.*, 2001 ; Reynaud *et al.*, 2005). Cette différence pourrait s'expliquer par une anomalie de formation du corps jaune mais, compte-tenu de la fréquence élevée des follicules polyovocytaires dans cette espèce, ces ovocytes pourraient provenir de tels follicules.

Si les ovocytes issus de follicules semblent avoir la capacité de parvenir jusqu'à l'ovulation, leur capacité à être fécondés demeure incertaine. Plusieurs auteurs ont tenté de féconder *in vitro* les ovocytes issus de follicules polyovocytaires. Iguchi *et al.* (1990) ont montré que, chez les souris traitées au DES, 52 % des ovocytes issus de follicules mono-ovocytaires étaient fécondés et atteignaient le stade 2 cellules, tandis que seulement 23 % des ovocytes issus de follicules polyovocytaires atteignent ce stade. Les follicules polyovocytaires sont donc capables de se développer après une fécondation artificielle mais les résultats sont limités, ce qui concorde avec les résultats obtenus chez la femme (Ron-El *et al.*, 1990) et chez la truie (Stankiewicz *et al.*, 2009).

L'éventualité d'un effet du nombre de follicules polyovocytaires sur la taille de la portée a souvent été évoquée. Cependant, Gougeon (1981) présente plusieurs arguments en défaveur d'un lien entre la naissance de jumeaux hétérozygotes et la présence de follicules polyovocytaires chez la femme. Dans son étude, la seule femme qui avait un nombre particulièrement élevé de follicules polyovocytaires (10 %) n'avait jamais eu de jumeaux. De plus, il estime la probabilité d'ovulation d'un follicule biovocytaire à 0,4 %, ce qui est très inférieur à la probabilité d'une double ovulation concomitante (6 %). Il souligne également que, du fait de la maturation souvent asynchrone des deux ovocytes, l'ovulation d'un tel follicule a de fortes chances de ne libérer qu'un seul ovocyte mature. Il indique enfin que le nombre de jumeaux hétérozygotes augmente avec l'âge des mères, tandis que le nombre de follicules polyovocytaires n'augmente pas avec l'âge des femmes. Chez la chienne, Reynaud *et al.* (2009) ont également montré que les ovocytes contenus dans les follicules polyovocytaires présentaient souvent une morphologie différente qui indique un développement asynchrone de ces ovocytes. De plus, lorsque, dans de rares cas, leur morphologie était identique, les cellules du *cumulus oophorus* présentaient des scores de mucification différents. Il semble donc que tous les ovocytes issus d'un même follicule polyovocytaire ne puissent être matures lors de l'ovulation.

De même, Telfer et Gosden (1981) évaluent la probabilité d'ovulation d'un follicule biovocytaire à 0,06 % chez la chienne (soit une chance sur 1 666), alors que dans cette espèce, les follicules polyovocytaires sont particulièrement nombreux.

Les conséquences de la présence de follicules polyovocytaires sont mal connues. Gougeon (1981) a évoqué la possibilité d'un lien entre la formation de tératomes ovariens et la présence de follicules polyovocytaires, mais dans son étude, les ovaires des 4 femmes

atteintes de tératomes ne présentaient pas plus de follicules polyovocytaires que ceux des femmes saines.

Stankiewicz *et al.* (2009) ont montré que, chez la truie, le liquide folliculaire des follicules polyovocytaires antraux contient des concentrations en moyenne deux fois plus élevées de 17β -œstradiol, des concentrations moindres de progestérone et des concentrations équivalentes de testostérone par rapports aux follicules mono-ovocytaires antraux. Ces différences peuvent être expliquées par la présence d'un nombre plus élevé de cellules de la granulosa et/ou d'une différence de l'activité aromatasase. En effet, l'ovocyte sécrète des substances capables d'activer la prolifération des cellules de la granulosa, d'activer l'aromatase, d'induire la synthèse d'œstradiol et d'inhiber la production de progestérone. Un nombre élevé de follicules polyovocytaires pourrait donc provoquer des perturbations endocriniennes, mais cette hypothèse n'a pas été démontrée.

CONCLUSION

La folliculogenèse est une étape clé de la reproduction. La production d'un ovocyte capable d'être fécondé est en effet indissociable de la croissance du follicule ovarien, compartiment associant ovocyte et cellules voisines, siège d'interactions cellulaires et moléculaires. Pourtant, très peu d'études se sont attachées à décrire son déroulement dans l'espèce féline. Alors que les techniques de reproduction assistée se sont récemment considérablement développées chez le chat et les félinés sauvages, il nous est apparu indispensable de réaliser une description histologique et morphologique précise de la croissance folliculaire chez la chatte.

Chez l'Homme, et chez beaucoup d'autres espèces animales, la folliculogenèse a déjà fait l'objet d'études particulières. Il est donc possible de comparer le développement folliculaire de ces espèces.

Dans notre étude, le diamètre du follicule primordial était de 44 μm en moyenne. Cette valeur semble relativement importante par rapport à celles obtenues chez les autres carnivores domestiques (25 μm chez la chienne ; Songsasen *et al.*, 2009) ou les autres mammifères (par exemple, 35 μm chez la femme ; Gougeon et Chainy, 1987). Alors que Gosden et Telfer (1987b) ont montré qu'il existait, chez les mammifères, une relation allométrique entre le diamètre du follicule primordial et le poids moyen de l'espèce considérée, la chatte semble donc être une exception. Malandain *et al.* (2006) ont montré que le diamètre folliculaire moyen à l'ovulation chez la chatte était de 3 mm. Sur ces observations, le follicule pré-ovulatoire de chatte semble suivre la relation établie par Gosden et Telfer (1987b), selon laquelle le diamètre maximal du follicule est lié au poids moyen de l'espèce. Cette relation ne paraît toutefois pas absolue. En effet, à titre de comparaison, les études menées chez la femme et la vache ont montré que les diamètres des follicules pré-ovulatoires étaient respectivement de 20 et de 10 mm dans ces espèces (Monniaux *et al.* 1997).

Concernant la croissance ovocytaire, nous avons déterminé que le diamètre moyen de l'ovocyte contenu dans les follicules primordiaux était de 40 μm dans l'espèce féline. De même que nous l'avons remarqué pour le diamètre folliculaire, l'ovocyte félin, au début de sa croissance, paraît de grande taille par rapport aux autres mammifères puisqu'il ne mesure que

18 μm chez la chienne (Songsasen *et al.*, 2009) et 32 μm chez la femme (Gougeon et Chainy, 1987). Cependant, alors que dans l'étude menée par Gosden et Telfer (1987b), les auteurs soulignaient la taille disproportionnée de l'ovocyte félin issu des grands follicules antraux comparativement aux autres espèces, nous n'avons pas observé un tel écart entre les données de la bibliographie et nos résultats. En effet, dans notre étude, l'ovocyte de chatte atteint un diamètre maximal moyen de 105 μm (ZP exclue). Cette valeur est donc inférieure à celles décrites chez la chienne et la femme, pour lesquelles le diamètre ovocytaire atteint 130 μm avant l'ovulation (Reynaud *et al.*, 2009 ; Gougeon, 1984).

Le follicule ovarien félin débute donc sa croissance à un diamètre relativement élevé par rapport aux autres espèces de mammifères, ce qui semble dû à un diamètre ovocytaire initialement important, mais sa taille et celle de l'ovocyte qu'il contient ne sont pas excessives au moment de l'ovulation.

De même que chez la plupart des mammifères déjà étudiés (souris : Brambell, 1928 ; hamster : Iwanatsu et Yanagimachi, 1975 ; Homme : Gougeon, 1984 ; vache : Fair *et al.*, 1995 ; Wandji *et al.*, 1996 ; marsupiaux : Rodger *et al.*, 1992 ; chienne : Songsasen *et al.*, 2009), notre étude a permis de mettre en évidence la croissance biphasique de l'ovocyte félin. Au cours du développement folliculaire, cette croissance se divise en deux phases : une phase de croissance rapide, proportionnelle à celle du follicule, et une phase de croissance beaucoup plus lente. Dans notre étude, la transition entre ces deux phases avait lieu juste après la formation de l'antrum, ce qui semble être également le cas chez les autres espèces. Après ce stade, la croissance ovocytaire est quasiment nulle. Récemment, Rodger *et al.* (1992) ont montré que, chez les marsupiaux, l'ovocyte reprenait sa croissance juste avant l'ovulation, ce qui ne semble pas être le cas dans notre étude.

Notre étude a également permis de montrer que, chez la chatte, la formation de l'antrum avait lieu pour un diamètre folliculaire compris entre 160 et 200 μm , ce qui représente 5 % de son diamètre pré-ovulatoire. Chez les autres espèces de mammifères étudiées, la cavité antrale apparaît le plus souvent dans les follicules de 200 μm environ (Gosden et Telfer, 1987b) mais le rapport entre le diamètre folliculaire à la formation de l'antrum et son diamètre pré-ovulatoire varie de 2 % chez la femme (Greenwald et Terranova, 1988), à 15 % chez le ouistiti (Gilchrist *et al.*, 1995).

Enfin, dans notre étude, la zone pellucide a été observée dès le stade follicule secondaire. Son épaisseur était en moyenne de 10 μm dans les grands follicules antraux mais aucune relation évidente n'a pu être établie entre son épaisseur et le diamètre ovocytaire ou folliculaire, même

si sa croissance était globalement ralentie lorsque l'ovocyte avait atteint son diamètre maximal.

Cette étude a fait l'objet d'une présentation lors du 6^{ème} Congrès ISCFR (*International Symposium on Canine and Feline Reproduction*) de Vienne en 2008 placée en annexe 5, ainsi que d'une publication scientifique en langue anglaise présentée en annexe 6.

BIBLIOGRAPHIE

AL-MUFTI W, BOMSEL-HELMREICH O, CHRISTIDES JP. (1988) Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, **82**, 15-25.

BAKER TG. (1982) Oogenesis and ovulation. In: AUSTIN CR, SHORT RV, editors. *Reproduction in mammals, Book 1: Germ cells and fertilization*. 2nd ed. Cambridge University Press, 17-45.

BAR-AMI S, TSAFRIRI A. (1981) Acquisition of meiotic competence in the rat : role of gonadotropin and estrogen. *Gamete Res.*, **4**, 463-472.

BARBER MR, LEE SM, STEFFENS WL, ARD M, FAYRER-HOSKEN RA. (2001) Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*, **55**, 1705-1717.

BLEIL JD, WASSARMAN PM. (1980a) Structure and function of the zona pellucida : identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.*, **76**, 185-202.

BLEIL JD, WASSARMAN PM. (1980b) Mammalian sperm-egg interaction : identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell.*, **20**, 873-882.

BLEIL JD, WASSARMAN PM. (1980c) Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1029-1033.

BLEIL JD, WASSARMAN PM. (1983) Sperm-egg interactions in the mouse : sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.*, **95**, 317-324.

BLEIL JD, BEALL CF, WASSARMAN PM. (1981) Mammalian sperm-egg interaction : fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Dev. Biol.*, **86**, 189-197.

BRAMBELL FWR. (1928) The development and morphology of the gonads of the mouse. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, **103**, 258-272.

BRAW-TAL R, YOSSEFI S. (1997) Studies in vivo on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*, **109**, 165-171.

BRISTOL-GOULD S, WOODRUFF TK. (2006) Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, **66**, 5-13.

- BUKOVSKY A, CAUDLE MR, SVETLIKOVA M, UPADHYAYA NB. (2004) Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **2**, 20.
- BYSKOV AG. (1975) The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *J. Reprod. Fertil.*, **45**, 201-209.
- BYSKOV AG. (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Phys. Rev.*, **66**, 71-117.
- BYSKOV AG, SKAKKEBAEK NE, STAFANGER G, PETERS H. (1977) Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J. Anat.*, **123**, 77-86.
- BYSTED BV, DIELEMAN SJ, HYTTEL P, GREVE T. (2001) Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J. Rpeod. Fertil. Suppl.*, **57**, 181-186.
- CASTILLA A, GARCIA C, CRUZ-SOTO M, MARTINEZ DE LA ESCALERA G, THEBAULT S, CLAPP C. (2009) Prolactin in ovarian follicular fluid stimulates endothelial cell proliferation. *J. Vasc. Res.*, **47**, 45-53.
- CHAFFAUX S, BAZILE C. (2001) La reproduction du chat et du chien. In : THIBAUT C, LEVASSEUR MC, editors. *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. 2^{ème} ed. Paris : Ellipses / I.N.R.A., 816-839.
- CLARKE HG, HOPE AS, BYERS S, RODGERS RJ. (2006) Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction*, **132**, 119-131.
- COGNIE Y, BENOIT F, POULIN N, KHATIR H, DRIANCOURT A. (1998) Effect of follicle size and of the Fec^B Booroola gene on oocyte function in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, **112**, 379-386.
- COMIZZOLI P, WILDT DE, PUKAZHENTHI BS. (2003) Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during non-breeding season. *Reproduction*, **126**, 809-816.
- CONCANNON P, HODGSON B, LEIN D. (1980) Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biol. Reprod.*, **23**, 111-117.
- DEDERER PH. (1934) Polyovular follicles in the cat. *Anat. Rec.*, **60**, 3 991-396.
- DE SMEDT V, CROZET N, GALL L. (1994) Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.*, **269**, 128-139.
- DIAZ FJ, WIGGLESWORTH K, EPPIG JJ. (2007) Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. *Dev. Biol.*, **305**, 300-311.

- DRIANCOURT MA, GOUGEON A, MONNIAUX D, RAYERE D, THIBAUT C. (2001) Folliculogenèse et ovulation. In : THIBAUT C, LEVASSEUR MC, editors. *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. 2^{ème} ed. Paris : Ellipses / I.N.R.A., 316-347.
- EDWARDS RG. (1974) Follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, **37**, 189-219.
- EPIFANO O, LIANG LF, FAMILARI M, MOOS MC, DEAN J. (1995) Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development*, **121**, 1947-1956.
- ESPEY LL. (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. Reprod.*, **50**, 233-238.
- EVANS AC. (2003) Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Dom. Anim.*, **38**, 240-246.
- FAIR T. (2003) Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.*, **78**, 203-216.
- FAIR T, HYTTEL P, GREVE T. (1995) Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcription activity. *Mol. Reprod. Dev.*, **42**, 437-442.
- FASSBENDER M, HILDEBRANDT YB, PARIS MCJ, COLENBRANDER B, JEWGENOW K. (2007) High-resolution ultrasonography of xenografted domestic cat ovarian cortex. *J. Reprod. Dev.*, **53**, 1023-1034.
- FLORMAN HM, WASSARMAN PM. (1985) O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*, **41**, 313-324.
- FLORMAN HM, BECHTOL KB, WASSARMAN PM. (1984) Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev. Biol.*, **106**, 243-255.
- FORTUNE JE. (2003) The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, **78**, 135-163.
- GILCHRIST RB, NAYADU PL, NOWSHARI MA, HODGES JK. (1995) Meiotic competence of Marmoset Monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol. Reprod.*, **52**, 1234-1243.
- GOMEZ MC, POPE CE, HARRIS R, DAVIS A, MIKOTA S, DRESSER BL. (2000) Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*, **12**, 423-433.
- GOODROWE KL, WALL RJ, O'BRIEN SJ, SCHMIDT PM, WILDT DE. (1988) Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, **39**, 355-372.
- GOODROWE KL, HOWARD JG, SCHMIDT PM, WILDT DE. (1989) Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in-vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **39**, 73-90.

- GOOK DA, EDGAR DH, BORG J, MARTIC M. (2008) Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. *Hum. Reprod.*, **23**, 394-402.
- GORE-LANGTON RE, DANIEL SJ. (1990) Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. *Biol. Reprod.*, **43**, 65-72.
- GOSDEN RG, TELFER E. (1987a) Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationship. *J. Zool.*, **211**, 169-175.
- GOSDEN RG, TELFER E. (1987b) Scaling of follicular sizes in mammalian ovaries. *J. Zool.*, **211**, 157-168.
- GOSDEN RG, BOULTON MI, GRANT K, WEBB R. (1994) Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J. Reprod. Fertil.*, **101**, 619-623.
- GOUDET G, MUGNIER S, CALLEBAUT I, MONGET P. (2008) Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution in vertebrates. *Biol. Reprod.*, **78**, 796-806.
- GOUGEON A. (1981) Frequent occurrence of multiovular follicles and multinuclear oocytes in the adult human ovary. *Fertil. Steril.*, **54**, 417-422.
- GOUGEON A. (1984) Caractères qualitatifs et quantitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain adulte. *Contracep. Fertil. Sex.*, **12**(3), 527-535.
- GOUGEON A. (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates : facts and hypotheses. *Endocr. Rev.*, **17**, 121-155.
- GOUGEON A, CHAINY GBN. (1987) Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J. Reprod. Fertil.*, **81**, 433-442.
- GREEN DPL. (1997) Three-dimensional structure of the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.*, **2**, 147-156.
- GREENWALD GS, TERRANOVA PF. (1988) Follicular selection and its control. In : KNOBIL E, NEILL JD, editors. *The physiology of reproduction*. New-York : Raven Press, 387-445.
- GREVE JM, WASSARMAN PM. (1985) Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structure repeat. *J. Mol. Biol.*, **181**, 253-264.
- GRIFFIN J, EMERY RB, HUANG I, PETERSON CM, CARRELL DT. (2006) Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig and human). *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.*, **3** (2).
- GUNZEL-APEL AR, KAWAUCHI R, NATRUP CP, HEDRICH HJ. (1998) Sonographische darstellung der physiologischen ovarfunktion im anovulatorischen und pseudograviden zyklus der katze. *Tierarztl. Prax. Augs. K. H.*, **26**, 275-283.

- IGUCHI T, FUKAZAWA Y, UESUGI Y, TAKASUGI N. (1990) Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.*, **43**, 478-484.
- IWADARE T, MORI H, ISHIGURO K, TAKEISHI M. (1984) Dimensional changes of tissues in the course of processing. *J. Microsc.*, **136**, 323-327.
- IWANATSU T, YANAGIMACHI R. (1975) Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *J. Reprod. Fertil.*, **45**, 83-90.
- JEWGENOW K. (1993) Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*, **39**, 527-535.
- JEWGENOW K. (1998) Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology*, **49**, 1567-1577.
- JEWGENOW K, PITRA C. (1993) Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*, **39**, 527-535.
- JEWGENOW K, GORITZ F. (1995) The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. *Anim. Reprod. Sci.*, **39**, 285-297.
- JEWGENOW K, FICKEL J. (1999) Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. *Biol. Reprod.*, **60**, 522-526.
- JEWGENOW K, RUDOLPH M. (2001) Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats – an ultrastructural immunohistological investigation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **57**, 23-29.
- JEWGENOW K, PARIS MCJ. (2006) Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology*, **66**, 93-100.
- JEWGENOW K, ROHLER M, WEGNER I. (2000) Differences between antigenic determinants of pig and cat zona pellucida proteins. *J. Reprod. Fertil.*, **119**, 15-23.
- JOHNSON J, CANNING J, KANEKO T, PRU JK, TILLY JL. (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, **428**, 145-150.
- KENNEDY WP. (1924) The occurrence of polyovular graafian follicles. *J. Anat.*, **58**, 328-334.
- LIU C, LITSCHER ES, MORTILLO S, SAKAI Y, KINLOCH RA, *et al.* (1996) Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of egg lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 5431-5436.
- LUNN MO, WRIGHT SJ. (2009) Imaging the zona pellucida of canine and feline oocytes using scanning electron microscopy. *Microsc. Microanal.*, **15**, 2-14.

- MALANDAIN E, RAULT D, FROMENT E, BAUDON S, BEGON D, CHASTANT-MAILLARD S. (2006) Croissance folliculaire et ovulation chez la chatte. *Bull. Acad. Vét. France*, **159**, 113-121.
- MAO J, WU G, SMITH MF, MCCAULEY TC, CANTLEY TC, *et al.* (2002) Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicle development and antrum formation in vitro. *Biol. Reprod.*, **67**, 1197-1203.
- MARCHAL R, VIGNERON C, PERREAU C, BALI-PAPP A, MERMILLOD P. (2002) Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, **57**, 1523-1532.
- MAULEON P. (1969) Oogenesis and folliculogenesis. *In*: COLE HH, CUPPS PT, editors. *Reproduction in Domestic Animals*, 2nd ed. New-York : Academic Press, 187-215.
- MCDUGALL K, HAY MA, GOODROWE KL, GARTLEY CJ, KING WA. (1997) Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **51**, 25-31.
- MERMILLOD P. (2001) Croissance et maturation de l'ovocyte in vivo et in vitro. *In*: THIBAUT C, LEVASSEUR MC, editors. *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. 2^{ème} ed. Paris : Ellipses / I.N.R.A., 348-366.
- MILLER DJ, GONG X, DECKER G, SHUR BD. (1993) Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J. Cell. Biol.*, **123**, 1431-1440.
- MOLLER CC, WASSARMAN PM. (1989) Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev. Biol.*, **132**, 103-112.
- MONNIAUX D, PISSELET C, FONTAINE J. (1994) Uncoupling between proliferation and differentiation of ovine granulosa cells in vitro. *J. Endocrinol.*, **142**, 497-510.
- MONNIAUX D, HUET C, BESNARD N, CLEMENT F, BOSCH M, PISSELET C, *et al.* (1997) Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **51**, 3-23.
- MONTELEONE P, ARTINI PG, SIMI G, CASAROSA E, CELA V, GENAZZANI AR; (2008) Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J. Assit. Reprod. Genet.*, **25**, 183-186.
- MOTLIK J, FULKA J. (1986) Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, **25**, 87-96.
- MUGNIER S, DELL'AQUILA ME, PELAEZ J, DOUET C, AMBRUOSI B, *et al.* (2009) New insights into the mechanisms of fertilization : comparison of the fertilization steps, composition, and structure of the zona pellucida between horses and pigs. *Biol. Reprod.*, **81**, 856-870.

- OTOI T, YAMAMOTO K, KOYAMA N, TACHIKAWA S, SUZUKI T. (1997) Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*, **48**, 769-774.
- OTOI T, MURAKAMI M, OOKA A, KARJA NWK, SUZUKI T. (2001) Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet. Rec.*, **148**, 116-118.
- PAYAN-CARREIRA R, PIRES MA. (2008) Multiocyte follicles in domestic dogs : a survey of frequency of occurrence. *Theriogenology*, **69**, 977-982.
- PEDERSEN T, PETERS H. (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.*, **17**, 555-557.
- PETERS H. (1969) The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol.*, **62**, 98-116.
- PICTON HM, GOSDEN RG. (1999) Oogenesis in mammals. In : KNOBIL E, NEILL JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego : Academic Press, 488-497.
- PONTIUS JU, MULLIKIN JC, SMITH DR, LINDBLAD-TOH K, GNERRE S, *et al.* (2007) Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res.*, **11**, 1675-1689.
- POPE CE, KELLER GL, DRESSER BL. (1993) In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **47**, 189-201.
- POPE CE, MCRAE MA, PLAIR BL, KELLER GL, DRESSER BL. (1997) In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **51**, 69-82.
- POPE CE, GOMEZ MC, DRESSER BL. (2006) In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology*, **66**, 59-71.
- PURSWELL BJ, KOLSTER KA. (2006) Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology*, **66**, 510-513.
- RANKIN TL, TALBOT P, LEE E, DEAN J. (1999) Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*, **126**, 3847-3855.
- RANKIN TL, O'BRIEN M, LEE E, WIGGLESWORTH K, EPPIG G, DEAN J. (2001) Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, **128**, 1119-1126.
- REDDING GP, BRONLUND JE, HART AL. (2007) Mathematical modeling of oxygen transport-limited follicle growth. *Reproduction*, **133**, 1095-1106.
- REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, THOUMIRE S, CHEBROUT M, *et al.* (2005) In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, **130**, 193-201.

- REYNAUD K, VIARIS DE LESEGNO C, CHEBROUT M, THOUMIRE S, CHASTANT-MAILLARD S. (2009) Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the preovulatory period in the female dog. *Theriogenology*, **72**, 1120-1131.
- RINGLEB J, ROHLEDER M, JEWGENOW K. (2004) Impact of feline zona pellucida glycoprotein B-derived synthetic peptides on in vitro fertilization of cat oocytes. *Reproduction*, **127**, 179-186.
- RODGER JC, GILES I, MATE KE. (1992) Unexpected oocyte growth after follicular antrum formation in four marsupial species. *J. Reprod. Fertil.*, **96**, 755-763.
- RODGERS RJ, IRVING-RODGERS HF, VAN WEZEL IL, KRUPA M, LAVRANOS TC. (2001) Dynamics of the membrane granulosa during expansion of the ovarian follicular antrum. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **171**, 41-48.
- RON-EL R, NACHUM H, GOLAN A, HERMAN A, YIGAL S, CASPI E. (1990) Binovular human ovarian follicles associated with in vitro fertilization : incidence and outcome. *Fertil. Steril.*, **54**, 869-872.
- SAINT-DIZIER M, MALANDAIN E, THOUMIRE S, REMY D, CHASTANT-MAILLARD S. (2007) Expression of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone receptors during follicular growth in the domestic cat ovary. *Mol. Reprod. Dev.*, **74**(8), 989-996.
- SCHICKLER M, LIRA SA, KINLOCH RA, WASSARMAN PM. (1992) A mouse oocyte-specific protein that binds to a region on mZP3 promoter responsible for oocyte-specific mZP3 gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 120-127.
- SCHRAMM RD, TENNIER MT, BOATMAN DE, BAVISTER BD. (1993) Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in non-stimulated rhesus monkeys. *Biol. Reprod.*, **48**, 349-356.
- SHALGI R, KRAICER P, RIMON A, PINTO M, SOFERMAN M. (1973) Proteins of human follicular fluid : the blood-follicle barrier. *Fertil. Steril.*, **24**, 429-434.
- SHEHATA R. (1974) Polyovular graafian follicles in a newborn kitten with a study of polyovuly in the cat. *Acta Anat. (Basel)*, **89**, 21-30.
- SHILLE VM, LUNDSTROM KE, STABENFELDT GH. (1979) Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol -17 β concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol. Reprod.*, **21**, 953-963.
- SHILLE VM, MUNRO C, FARMER SW, PAPPKOFF H, STABENFELDT GH. (1983) Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *J. Reprod. Fertil.*, **69**, 29-39.
- SHIN T, KRAEMER D, PRYOR J, LIU L, RUGILA J, *et al.* (2002) A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, **415**, 859.

SONGSASEN N, FICKES A, PUKAZHENTHI BS, WILDT DE. (2009) Follicular morphology, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reprod. Dom. Anim.*, **44** (Suppl. 2), 65-70.

SORENSEN RA, WASSARMAN PM. (1976) Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.*, **50**, 531-536.

STANKIEWICZ T, BLASZCZYK B, UDALA J. (2009) A study on the occurrence of polyovular follicles in porcine ovaries with particular reference to intrafollicular hormone concentrations, quality of oocytes and their in vitro fertilization. *Anat. Histol. Embryol.*, **38**, 233-239.

TELFER E, GOSDEN RG. (1987) A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.*, **81**, 137-147.

TSUJI K, SOWA M, NAKANO R. (1985) Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol. Reprod.*, **32**, 413-417.

TSUTSUI T. (2006) Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*, **66**, 122-125.

TSUTSUI T, YAMANE I, HATTORI I, KUROSAWA N, MATSUNAGA H, *et al.* (2000) Feline embryo transfer during the non-breeding season. *J. Vet. Med. Sci.*, **62**, 1169-1175.

UPADHYAY S, ZAMBONI L. (1982) Ectopic germ cells : natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6584-6588.

WANDJI SA, SRSEN V, VOSS AK, EPPIG JJ, FORTUNE JE. (1996) Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol. Reprod.*, **55**, 942-948.

WASSARMAN PM, LITSCHER ES. (2008) Mammalian fertilization : the egg's multifunctional zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.*, **52**, 665-676.

WASSARMAN P, CHEN J, COHEN N, LITSCHER E, LIU C, *et al.* (1999) Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J. Exp. Zool.*, **285**, 251-258.

SPINDLER RE, WILDT DE. (1999) Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol. Reprod.*, **61**, 188-194.

WILDT DE, CHAN SYW, SEAGER SWJ, CHAKRABORTY PK. (1981) Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol. Reprod.*, **25**, 15-28.

WOOD TC, MONTALI RJ, WILDT DE. (1997) Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol. Reprod. Dev.*, **46**, 190-200.

YIN XJ, LEE HS, KIM LH, SHIN HD, CHO SJ, *et al.* (2008a) Production of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, **69**, 1001-1006.

YIN XJ, LEE HS, YU XF, CHOI E, KOO BC, *et al.* (2008b) Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein. *Biol. Reprod.*, **78**, 425-431.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Protocole de fixation et d'inclusion des ovaires de chatte.....	1
ANNEXE 2 : Protocole de coloration des lames histologiques (Hematoxyline-Eosine-Safran).....	2
ANNEXE 3 : Tableau de recueil des données.....	3
ANNEXE 4 : Caractéristiques des chattes et des ovaires inclus dans l'étude.....	4
ANNEXE 5 : Poster et résumé présentés au 6 ^{ème} Congrès ISCFR (<i>International Symposium on Canine and Feline Reproduction</i>) de Vienne en 2008.....	5
ANNEXE 6 : REYNAUD K, GICQUEL C, THOUMIRE S, CHEBROUT M, FICHEUX C, BESTANDJI M, CHASTANT-MAILLARD S. (2009) Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. <i>Reprod. Dom. Anim.</i> , 44 , 174-179.....	6

ANNEXE 1 :

PROTOCOLE DE FIXATION ET D'INCLUSION DES OVAIRES DE CHATTES.

FIXATION

- ❖ Rinçage dans le **Phosphate Buffered Saline (PBS)**
(Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)
- ❖ **Formaldéhyde 10 %** *1 semaine* *4°C*
(v/v, VWR, Fontenay sous Bois, France)

DESHYDRATATION ET INCLUSION

- ❖ **Ethanol 50°** *2 heures* *Température ambiante*
(VWR)
- ❖ **Ethanol 100°** *2 heures* *Température ambiante*
- ❖ **Ethanol 100°** *Une nuit* *4°C*

- ❖ **Butanol** *1 heure* *Température ambiante*
(Sigma-Aldrich)
- ❖ **Butanol** *1 heure* *60°C*
- ❖ **Paraffine** *1 heure* *60°C*
(Paraplast, CML, Nemours, France)
- ❖ **Paraffine** *2 heures* *60°C*
- ❖ **Paraffine** *3 heures* *60°C*

- ❖ Inclusion de l'ovaire dans les moules plastiques cubiques remplis de paraffine à 60°C,
puis durcissement à température ambiante

ANNEXE 2 :

PROTOCOLE DE COLORATION DES LAMES HISTOLOGIQUES (HES).

REHYDRATATION

❖ Toluène (Sigma-Aldrich)	<i>2 bains</i>	<i>10 minutes</i>
❖ Ethanol 100° (VWR)	<i>1 bain</i>	<i>5 minutes</i>
❖ Ethanol 95°	<i>1 bain</i>	<i>5 minutes</i>
❖ Eau	<i>1 bain</i>	<i>5 minutes</i>

COLORATION

❖ Hemalun (RAL, CML)	<i>1 bain</i>	<i>5 minutes</i>
❖ Eau	<i>3 bains</i>	<i>2 minutes</i>
❖ Eau chlorhydrique 10 gouttes d'acide chlorhydrique dans 210 mL d'eau distillée (Sigma-Aldrich)	<i>1 passage</i>	
❖ Eau	<i>1 bain</i>	<i>2 minutes</i>
❖ Carbonate de lithium (Sigma-Aldrich)	<i>1 passage</i>	
❖ Eau	<i>1 bain</i>	<i>2 minutes</i>
❖ Eosine 4 g d'Eosine dans 1L d'eau distillée +/- 4 g d'Erythrosine (RAL, CML)	<i>1 bain</i>	<i>1 minute</i>
❖ Eau	<i>2 bains</i>	<i>2 minutes</i>
❖ Ethanol 100°	<i>1 bain</i>	<i>2 minutes</i>
❖ Safran 10 g de Safran dans 1L d'éthanol 100° (RAL, CML)	<i>1 bain</i>	<i>3 minutes</i>
❖ Toluène	<i>2 bains</i>	<i>5 minutes</i>

ANNEXE 3 :

TABLEAU DE RECUEIL DES DONNEES.

	Ovocyte (Objectif x40)											Follicule					
	Sans pellucide						Avec pellucide					Objectif	Lame	Mesure 1	Mesure 2	Moyenne (graduations)	µm
	Stade	Lame	Mesure 1	Mesure 2	Moyenne (graduations)	Mesure 1	Mesure 2	Moyenne (graduations)	µm								
Follicule 1	I ^{al}	3	16	16	16	16	16	16	40	40	3	17	17	17	17	42.5	
Follicule 2	I ^{al}	7	19	18	18.5	19	18	18.5	46.2	40	7	20	19	19.5	19	48.7	
Follicule 3	I ^{al}	8	15	15	15	15	15	15	37.5	40	8	16	17	16.5	17	41.2	
Follicule 4	I ^{al}	19	18	15	16.5	18	15	16.5	41.2	40	19	19	16	17.5	16	43.7	
Follicule 5	I ^{al}	23	16	16	16	16	16	16	40	40	23	17	17	17	17	42.5	
Follicule 6	I ^{al}	55	19	11	15	19	11	15	37.5	40	55	20	13	16.5	13	41.2	
Follicule 7	I ^R	14	37	23	30	37	23	30	75	40	14	44	34	39	34	97.5	
Follicule 8	I ^R	15	20	20	20	20	20	20	50	40	15	28	26	27	26	67.5	
Follicule 9	I ^R	62	30	28	29	30	28	29	72.5	40	62	38	38	38	38	95	
Follicule 10	I ^R	72	33	32	32.5	33	32	32.5	81.2	40	72	45	41	43	41	107	
Follicule 11	I ^R	77	34	27	30.5	34	27	30.5	76.2	40	77	44	37	40.5	37	101	
Follicule 12	II ^R	57	30	33	31.5	32	34	33	82.5	40	57	47	46	46.5	46	116	
Follicule 13	II ^R	60	40	39	39.5	42	42	42	105	40	60	60	49	54.5	49	136	

ANNEXE 4 :

**CARACTERISTIQUES DES CHATTES ET DES
OVAIRES INCLUS DANS L'ETUDE.**


	Nom	Âge (années)	Nombre de follicules observés	Diamètre folliculaire inférieur	Diamètre folliculaire supérieur
1	Juan	NC	184	42,5 µm	2275 µm
2	Sissi	0,83			
3	Noa	2,25			
4	Minou	1,67			
5	Zazy	1,5			
6	Samba	NC			
7	Nougatine	NC			
8	Lili	NC			
9	Fripouille	0,67			
10	Rose	1,67			
11	Tara	NC	9	213 µm	670 µm
12	Griffonne	0,83	41	100 µm	963 µm
13	Tartine	0,75	22	135 µm	2550 µm
14	Aby	2,75	36	223 µm	875 µm
15	Caline	NC	37	310 µm	1775 µm
16	Salsa	1,42	29	605 µm	3660 µm
17	Zouzou	NC	46	41 µm	2775 µm
18	Lisa	NC	56	305 µm	1375 µm
19	Chipie	0,92	34	42 µm	3162 µm
20	Pitchoune	NC	26	73 µm	1850 µm
21	Loutre	NC	6	81 µm	3225 µm
22	Flocon	1	16	42 µm	2525 µm
23	Griotte	NC	34	35 µm	2525 µm
24	Mina	1	5	90 µm	1937 µm
25	Madonna	1,17	18	34 µm	2612 µm
26	Frimousse	0,58	1	1612 µm	1612 µm
27	Marguerite	NC	18	38 µm	3337 µm
28	Hermione	NC	28	45 µm	2487 µm
29	Javel	0,83	34	43 µm	1625 µm
30	Bigoudi	0,83	42	41 µm	1725 µm
31	Coca	NC	27	41 µm	1500 µm
32	Pilou	NC	24	34 µm	2100 µm
33	Mirette	NC	7	1762 µm	2387 µm
34	Vodka	1	1	2474 µm	2474 µm
35	Coton	1	11	50 µm	3400 µm
36	Teigne	NC	3	1162 µm	2312 µm
37	Myrtille	0,58	5	2487 µm	2975 µm
38	Pixie	1	5	875 µm	3112 µm

39	Calypso	0,58	7	925 μm	2625 μm
40	Taska	<i>NC</i>	6	925 μm	1887 μm
41	Shakira	<i>NC</i>	4	1162 μm	2275 μm
42	Vikim	0,67	8	90 μm	2287 μm
43	Gribouille	0,58	2	2137 μm	2200 μm
<i>TOTAL</i>			832 follicules	34 μm	3600 μm


NC : Non Connu

ANNEXE 5 :

POSTER ET RESUME PRESENTES AU 6^{EME}
 CONGRES ISCFR (*International Symposium on Canine
 and Feline Reproduction*) DE VIENNE 2008.



Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary

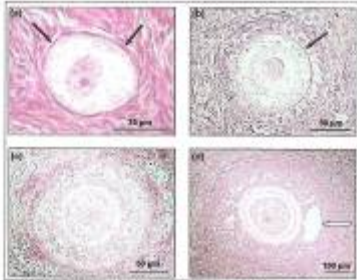


Karine Reynaud, Coralie Gioquel, Sandra Thoumine, Marine Chebrou, Christine Ficheux, Magali Bestandji, Sylvie Chastant-Maillard
 UMR 1108 INRA / EMVA / CNRS₁₂₂ Biologie du Développement et Reproduction, Alfort National Veterinary School, Maisons-Alfort, France

Introduction
 The domestic cat is the only species not considered as endangered among the thirty-seven known felids (Pelton et al., 2006). Indeed, Feline cubs suffer from overpopulation in many countries around the world (Furewell and Kohler, 2006). However, cat breeders and some owners want to produce litters from their animals. Clinicians and researchers are therefore asked simultaneously to limit ovarian activity and conversely to develop reproductive biotechnologies such as artificial insemination, embryo transfer, in vitro embryo production. Both objectives demand some fundamental knowledge of reproductive physiology in cat, which is still lacking. This study was thus designed to describe, both quantitatively (morphometry) and qualitatively (histological differentiation), follicle and oocyte growth in the feline ovary.

Material and Methods
 The ovaries of 43 cats were collected after routine neutering and processed for histological observation after being embedded in paraffin. The diameters of 832 follicle / oocyte pairs were measured using a microscope equipped with an ocular micrometer, with and without zona pellucida. A special emphasis was placed on the study of early folliculogenesis: primordial (n=52), primary (n=53), secondary (n=50), preantral (n=50) and early antral (n=52) follicles were studied.

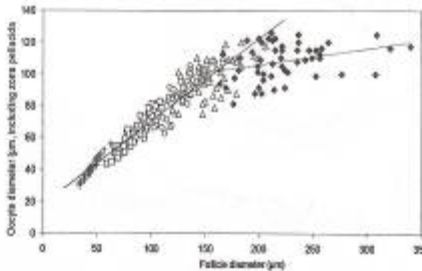
Results



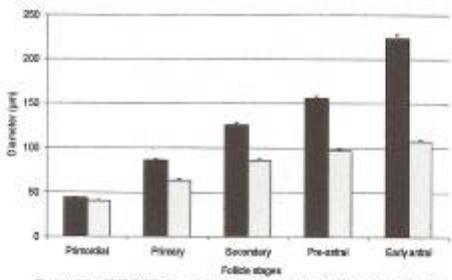
Feline follicles at the primordial (a), secondary (b), preantral (c) and early antral (d) stages. Note the fine granulosa cells (a, black arrows), the appearance of zona pellucida (b, black arrow) and of antral cavity (d, white arrow).

Stages	n	Follicle diameter (µm)	Oocyte diameter (µm) (with zona pellucida)	Zone pellucida thickness (µm)
Primordial	52	44.3 ± 0.8 (33.5 – 62.5)	40.5 ± 0.8 (30.0 – 60.3)	0
Primary	53	60.2 ± 1.6 (58.8 – 110.0)	63.8 ± 1.4 (43.0 – 102.5)	0
Secondary	50	126.0 ± 2.2 (86.3 – 198.8)	86.2 ± 1.8 (58.8 – 107.5)	2.7 ± 0.1 (1.3 – 4.4)
Preantral	50	195.6 ± 2.9 (117.5 – 206.2)	97.3 ± 1.8 (67.5 – 120.0)	3.3 ± 0.1 (2.5 – 5)
Early antral	52	223.8 ± 5.3 (103.8 – 340.0)	108.1 ± 1.6 (81.3 – 126.3)	8.4 ± 0.1 (1.9 – 5.6)

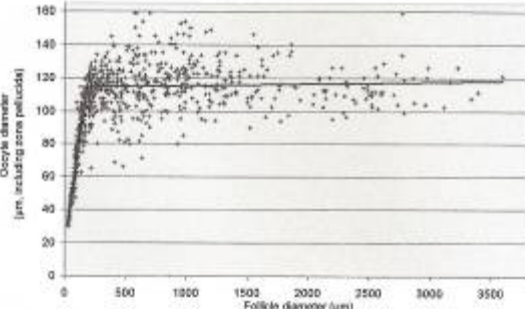
Follicle and oocyte diameters during early stages of folliculogenesis. Results are expressed as mean ± SEM. Ranges are indicated between brackets.



Early folliculogenesis: changes in follicle and oocyte diameters in primordial (+, n=52), primary (□, n=53), secondary (○, n=50), preantral (△, n=50) and early antral (●, n=52) follicles in cat ovaries.



Progression of follicle (black) and oocyte (with zona pellucida, grey) diameters in the 5 follicle types through the early folliculogenesis. Bar errors express SEM.



Follicle and oocyte growth during late folliculogenesis. Diameters were measured in 832 follicle / oocyte pairs.

A biphasic pattern of follicle and oocyte growth was observed. During the first phase, before antrum formation, follicle (x) and oocyte (y) size were positively and linearly correlated ($y = 0.500x + 20.01$, $r^2 = 0.89$). Antrum formation occurred when the follicle reached around 200 µm in diameter and the oocyte reached 102 µm (~60% of its maximal diameter, i.e. 170 µm). After antrum formation, decoupling between follicle and oocyte growth was observed, with a minimal increase in oocyte size contrasting with a significant follicle development ($y = 0.001x + 114.90$, $r^2 = 0.01$). The preantral follicle diameter was ~3500 µm.

Conclusions
 These results suggest that (1) in feline ovary, the pattern of follicle and oocyte growth is similar to that observed in other mammals, (2) the oocyte had achieved more than 90 % of its maximal growth by the time the antral cavity forms. Furthermore, Choi et al. (2001) analysed the link between oocyte size and meiotic competence (ability to mature in vitro and reach the MI stage) and reported that no more increase in meiotic competence was detectable in oocytes larger than 110µm. This means that (3) oocytes with nuclear competence originate from follicles larger than 200-300 µm.

Ols T, Szendrei M, Csiki A, Keszler M, Szilagyi T. 2001. Effects of size and stage dependent on stable composition of oocyte. Mol. Cell. Biol. 21:119-123. PMID:161. RINGIER. Pubmed.ncbi.nlm.nih.gov. 2006. Ovarian oestrogen production in the domestic cat and implications. Theriogenology 66:27-40. PMID:161. RINGIER. 2006. Theriogenology 66:27-40.

FOLLICULOGENESIS AND MORPHOMETRY OF OOCYTE AND FOLLICLE GROWTH IN THE FELINE OVARY

Karine Reynaud, Coralie Gicquel, Sandra Thoumire, Martine Chebrou, Christine Ficheux, Magali Bestandji, Sylvie Chastant-Maillard
UMR 1198 INRA / ENVA / CNRS_{FRE} Biologie du Développement et Reproduction, Alfort National Veterinary College, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France. E-mail: kreynaud@vet-alfort.fr

This study was designed to describe, both quantitatively (morphometry) and qualitatively (histological differentiation), follicle and oocyte growth in the feline ovary.

Materials and methods - The ovaries of 43 cats were collected and processed for histology. The diameters of 832 follicle / oocyte pairs were measured, with and without zona pellucida, and a special emphasis was placed on the study of early folliculogenesis.

Results - Primordial, primary, secondary, preantral and early antral follicles were measured at 44.3 μm , 86.2 μm , 126.0 μm , 155.6 μm and 223.8 μm in diameter respectively. A biphasic pattern of follicle and oocyte growth was observed. Before antrum formation, follicle (x) and oocyte (y) size were positively and linearly correlated ($y = 0.500 x + 20.01$, $r^2 = 0.89$). Antrum formation occurred when the follicle reached 160 - 200 μm in diameter (when oocyte was at 102 μm). After antrum formation, a decoupling was observed, a minimal increase in oocyte size contrasting with a significant follicle development ($y = 0.001 x + 114.39$, $r^2 = 0.01$). The preovulatory follicle diameter was $\sim 3500 \mu\text{m}$ and the maximal oocyte diameter was 115 μm . The zona pellucida, absent in primordial and primary follicles, appeared at the secondary stage and reached almost 6 μm at the preovulatory stage.

Conclusions - These results suggest that (1) in feline ovary, follicle and oocyte growth pattern is similar to that observed in other mammals, (2) the antrum forms in 160 – 200 μm follicles, which represents 5% of the preovulatory diameter, (3) the oocyte had achieved more than 90 % of its maximal growth at the antrum formation.

ANNEXE 6 :

**REYNAUD K, GICQUEL C, THOUMIRE S,
CHEBROUT M, FICHEUX C, BESTANDJI M,
CHASTANT-MAILLARD S. (2009) Folliculogenesis and
morphometry of oocyte and follicle growth in the feline
ovary. *Reprod. Dom. Anim.*, 44, 174-179.**

Folliculogenesis and Morphometry of Oocyte and Follicle Growth in the Feline Ovary

K Reynaud¹, C Gicquel¹, S Thoumire¹, M Chebrou¹, C Ficheux¹, M Bestandji¹ and S Chastant-Maillard^{1,2}

¹UMR 1198 INRA/ENVA/CNRS_{FR} Biologie du Développement et Reproduction; ²Department of Reproduction, Alfort National Veterinary College, Maisons-Alfort Cedex, France

Contents

This study was designed to describe, both quantitatively (morphometry) and qualitatively (histological differentiation), follicle and oocyte growth in the feline ovary. The ovaries of 43 cats were collected and processed for histology. The diameters of 832 follicle/oocyte pairs were measured, with and without zona pellucida (ZP), and a special emphasis was placed on the study of early folliculogenesis. Primordial, primary, secondary, pre-antral and early antral follicles were measured at 44.3, 86.2, 126.0, 155.6 and 223.8 µm in diameter respectively. A biphasic pattern of follicle and oocyte growth was observed. Before antrum formation, follicle (x) and oocyte (y) size were positively and linearly correlated ($y = 0.500x + 20.01$, $r^2 = 0.89$). Antrum formation occurred when the follicle reached 160–200 µm in diameter (when oocyte was at 102 µm). After antrum formation, a decoupling was observed, a minimal increase in oocyte size contrasting with a significant follicle development ($y = 0.001x + 114.39$, $r^2 = 0.01$). The pre-ovulatory follicle diameter was approximately 3500 µm and the maximal oocyte diameter was 115 µm. The ZP, absent in primordial and primary follicles, appeared at the secondary stage and reached almost 6 µm at the pre-ovulatory stage. These results suggest that (i) in feline ovary, follicle and oocyte growth pattern is similar to that observed in other mammals; (ii) the antrum forms in 160–200 µm follicles, which represents 5% of the pre-ovulatory diameter and (iii) the oocyte had achieved more than 90% of its maximal growth at the stage of antrum formation.

Introduction

The domestic cat is the only species not considered as endangered among the 37 known felids (Pelican et al. 2006). Indeed, *Felis catus* suffers from overpopulation in many countries around the world (Purswell and Kolster 2006). However, cat breeders and some owners want to produce kittens from their animals. Clinicians and researchers are therefore asked simultaneously to develop biological techniques designed to limit ovarian activity and conversely to develop reproductive biotechnologies, such as artificial insemination, embryo transfer and *in vitro* embryo production. Both objectives demand some fundamental knowledge of reproductive physiology in cat, which is still lacking.

Whereas the endocrinology of the feline oestrous cycle has been thoroughly described (Shille et al. 1979; Wildt et al. 1981; Goodrowe et al. 1989), and despite many *in vitro* maturation works (Goodrowe et al. 1988), follicular dynamics in this species remains largely unknown. Ovulatory diameter (3–4 mm) has been determined initially through laparotomy/laparoscopy (Wildt et al. 1981; Goodrowe et al. 1989). More recently, two studies followed terminal follicular growth

(from 1 mm until ovulation) by ultrasonography (Günzel-Apel et al. 1998; Malandain et al. 2006). But studies encompassing evaluations of follicle diameter, follicle stage and oocyte diameter remain quite incomplete (Gosden and Telfer 1987; Barber et al. 2001; Bristol-Gould and Woodruff 2006).

This study presents a complete histological and morphometric analysis of follicle growth in the cat, from the primordial through to the pre-ovulatory stage. It was conducted using evaluation of four criteria: follicle diameter, follicle stage, oocyte diameter and zona pellucida (ZP) thickness. The objective was to determine the main stages of folliculogenesis in the cats, such as antrum formation and acquisition of developmental competence of the oocyte.

Materials and Methods

Collection of feline ovaries

Ovaries were collected from 43 cats (1.17 ± 0.09 years old; range 0.58–3.33) after routine neutering without any hormonal stimulation in the Surgery department of the Alfort veterinary college. The ovaries were stored at 38°C in phosphate buffer saline solution and selected within 1 h after collection. Only ovaries without corpora lutea but with numerous follicles measuring 1–3.5 mm in diameter were selected and fixed in formaldehyde 10% solution for 1 week. At least five of the 43 cats exhibited behavioural signs of oestrus.

Histological preparation and measurements of follicle/oocyte diameters

After fixation, ovaries were gradually dehydrated in alcohol solutions prior to embedding in paraffin (Paraplast; CML, Nemours, France). Both ovaries from each animal were serially sectioned at 7 µm, stained with haematoxylin–eosin–safran and mounted in Eukitt medium (CML).

For each cat, primordial to pre-ovulatory follicles were observed (BX41 microscope; Olympus, Rungis, France) and measured using an ocular micrometer. Only follicles without obvious signs of atresia (regular shape, well-organized granulosa cells) were included. Follicle diameter (two perpendicular diameters, with the basement membrane as limit) and oocyte diameter (two perpendicular diameters, with the ZP and without ZP, with the oocyte cytoplasmic membrane as limit) were measured at the highest magnification possible ($\times 400$ magnification for follicles < 300 µm, $\times 200$ – $\times 100$ for

300–1000 μm follicles and $\times 40$ for follicles $> 1000 \mu\text{m}$). Primordial follicles were considered only when completely surrounded by flattened granulosa cells; for those and for primary follicles, both follicle and oocyte diameters were measured on the section with a visible oocyte nucleus. From secondary follicles onwards, the maximal follicle diameter was carefully determined by following the same follicle on consecutive sections. Oocyte diameter in these follicles was measured on the section evidencing the oocyte nucleus. For each female, all follicles $> 1 \text{ mm}$ in diameter have been recorded. Taking into account all follicle sizes, a mean of 19.6 ± 2.7 follicles per female have been measured. Multi-oocytic follicles, which are particularly common in the feline species (Telfer and Gosden 1987), were not observed in this study.

Follicle classification during early stages of folliculogenesis

The classification system proposed by Pedersen and Peters (1968) was used to identify follicles as primordial (one layer of flattened granulosa cells), primary and secondary (one layer and two layers of cuboidal granulosa cells respectively), pre-antral (more than two layers of granulosa cells but absence of antral cavity) or early antral (appearance of the antral cavity).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM and were considered significant when $p < 0.05$. Comparison of follicle diameters, oocytes diameters and ZP thickness in relation with histological follicle stage was performed by ANOVA and Student Neuman Keuls test (SAS, Cary, NC, USA). The same process was used for comparison of ZP thickness in the different follicle size classes. A regression test was performed to calculate Pearson's correlation factor (SAS). Equations of regression curves were calculated using Excel software (Office XP, Microsoft, Courtaboeuf, France).

Results

Description of early folliculogenesis

The maximal diameter and the follicle stages were determined for each follicle on a total of 257 follicles, ranging from primordial to early antral stage (Table 1). The smallest primordial follicle (oocyte encompassed with a complete layer of flattened granulosa cells; Fig. 1a) observed was $33.8 \mu\text{m}$ in diameter and the largest early antral follicle was measured at $340.0 \mu\text{m}$.

Primordial follicles were approximately $45 \mu\text{m}$ in diameter. Once they left the ovarian reserve, their diameter doubled, reaching a mean of nearly $90 \mu\text{m}$ in primary follicles. The follicle size then continued to increase significantly ($p < 0.0001$): secondary (Fig. 1b), pre-antral (Fig. 1c) and early antral follicles (Fig. 1d) presented mean diameters of 126.0 , 157.1 and $223.8 \mu\text{m}$ respectively. Even if the maximal diameter reported in this study for pre-antral follicles was $206 \mu\text{m}$, the formation of an antral cavity was observed starting from a diameter of $164 \mu\text{m}$. Both pre-antral and early-antral stages were present in follicles with diameters between 164 and $206 \mu\text{m}$. Above $206 \mu\text{m}$, all follicles were at the antral stage.

Relationship between follicle and oocyte growth

The largest diameter of the oocyte was measured in each of the 257 histologically-characterized follicles. Mean oocyte diameter at each follicular stage is presented in Table 1. The relationship between follicle and oocyte diameters is presented on Fig. 2, with reference to the follicular stage. Before antrum formation, oocyte growth parallels that of the surrounding follicle. The correlation in size between oocyte and follicle is well described by a linear model ($y = 0.526x + 17.68$, $r^2 = 0.92$, $p < 0.0001$), with $x =$ follicular diameter and $y =$ oocyte diameter.

From the onset of antrum formation, the oocyte grows more slowly than the follicle and the above correlation is not longer significant ($r^2 = 0.11$). In antral follicles, however, the relationship between oocyte and follicle diameters also follows a linear model ($y = 0.10x + 85.68$, $p < 0.015$), but the slope of the straight line is significantly reduced after antrum formation. The intersection of these two straight lines corresponds to a $160 \mu\text{m}$ follicle enclosing an oocyte of $102 \mu\text{m}$, i.e. to the moment of antrum formation, reinforcing the biological relevance of the two equations. The decoupling between oocyte and follicle growth is also clearly visible in Fig. 3.

In the second part of our study, we performed a morphometric analysis of the whole folliculogenesis and measured 575 additional follicles (832 follicles in total), involving observation and parallel measurements of follicle and oocyte diameters. The follicles used ranged from 34 to $3600 \mu\text{m}$ in diameter, $3600 \mu\text{m}$ being the maximal follicular diameter we encountered in ovaries obtained from cats after several days of oestral behaviour. The relationship between follicle and oocyte diameters in this population is presented in Fig. 4. Using the threshold reported above in our histological

Stages	n	Follicle diameter (μm)	Oocyte diameter (μm) (with zona pellucida)	Zona pellucida thickness (μm)
Primordial	52	44.3 ± 0.8^a (33.8–62.5)	40.5 ± 0.8^a (30.0–56.3)	0 ^a
Primary	53	86.2 ± 1.8^b (58.8–110.0)	63.8 ± 1.4^b (43.8–82.5)	0 ^a
Secondary	50	126.0 ± 2.2^c (86.3–158.8)	86.2 ± 1.8^c (58.8–107.5)	2.7 ± 0.1^b (1.3–4.4)
Pre-antral	50	155.6 ± 2.9^d (117.5–206.2)	97.3 ± 1.8^d (67.5–120.0)	3.3 ± 0.1^c (2.5–5)
Early antral	52	223.8 ± 5.3^e (163.8–340.0)	108.1 ± 1.6^e (81.3–126.3)	3.4 ± 0.1^c (1.9–5.6)

Table 1. Follicle and oocyte diameters during early stages of folliculogenesis

Results are expressed as mean \pm SEM. Ranges are indicated between brackets.

Within the same column, numbers with different superscript letters were significantly different ($p < 0.0001$).

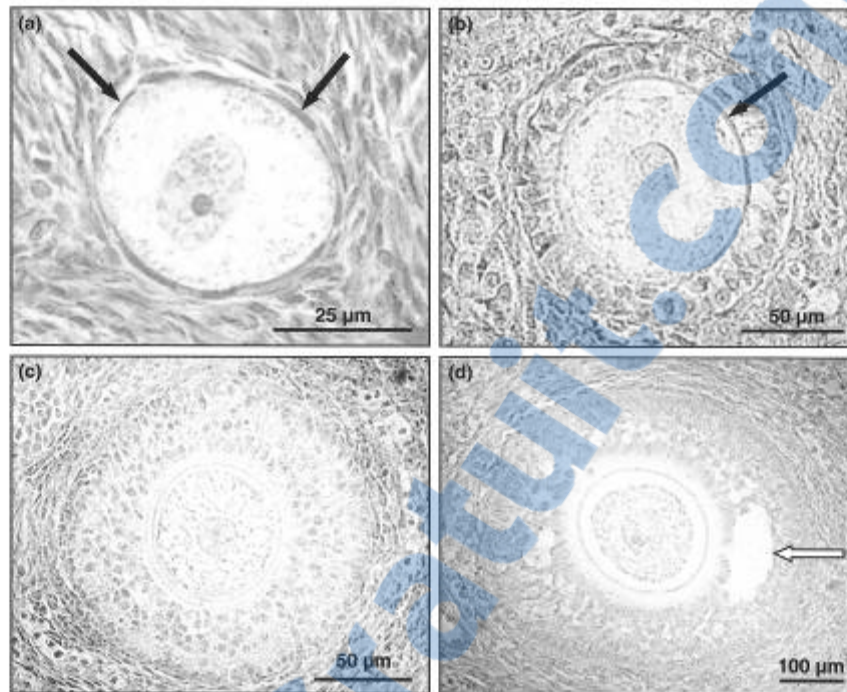


Fig. 1. Feline follicles at the primordial (a), secondary (b), pre-antral (c) and early antral (d) stages. Note the flat granulosa cells (a, black arrows), the appearance of zona pellucida (b, black arrow) and of antral cavity (d, white arrow)

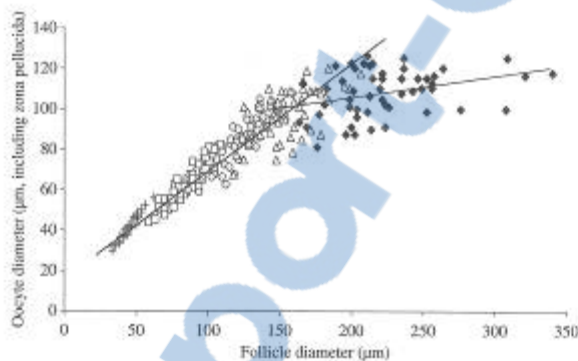


Fig. 2. Early folliculogenesis: changes in follicle and oocyte diameters in primordial (+, $n = 52$), primary (\square , $n = 53$), secondary (\circ , $n = 50$), pre-antral (\triangle , $n = 50$) and early antral (\blacklozenge , $n = 52$) follicles in cat ovaries

study ($200 \mu\text{m}$, the limit above which no more pre-antral follicles were observed), follicular growth appeared to be well described by two linear regressions. In follicles from 34 to $200 \mu\text{m}$, the equation was $y = 0.500x + 20.01$ ($r^2 = 0.89$, $p < 0.0001$, $n = 287$), quite similar to that computed from our initial analysis.

Above $200 \mu\text{m}$ in diameter, as previously, the slope was steeply reduced, with only a slight variation in oocyte diameters compared with a significant growth of follicle ($y = 0.001x + 114.39$, $r^2 = 0.01$, $p < 0.0002$, $n = 545$). The intersection between the two straight lines corresponded with a follicle of $189 \mu\text{m}$ including a

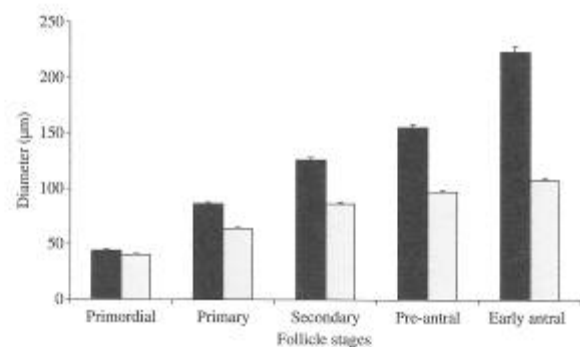


Fig. 3. Progression of follicle (black) and oocyte (with zona pellucida, grey) diameters in the five follicle types through the early folliculogenesis. Bar errors express SEM

$114.6 \mu\text{m}$ oocyte. After antrum formation and at the end of follicular growth (follicles $> 2500 \mu\text{m}$), the diameter attained by the mature oocyte was approximately $115 \mu\text{m}$ (115.00 ± 2.21 ranging from 99 to $159 \mu\text{m}$). Taken together, these results show that, at the time of antrum formation, the oocyte has achieved 89% of its final diameter and 70% of its final volume ($4/3 \pi R^3$ with $R = \text{diameter}/2$).

The ZP: appearance and progression in size

Zona pellucida was absent in primordial and primary follicles and was first measurable in secondary follicles

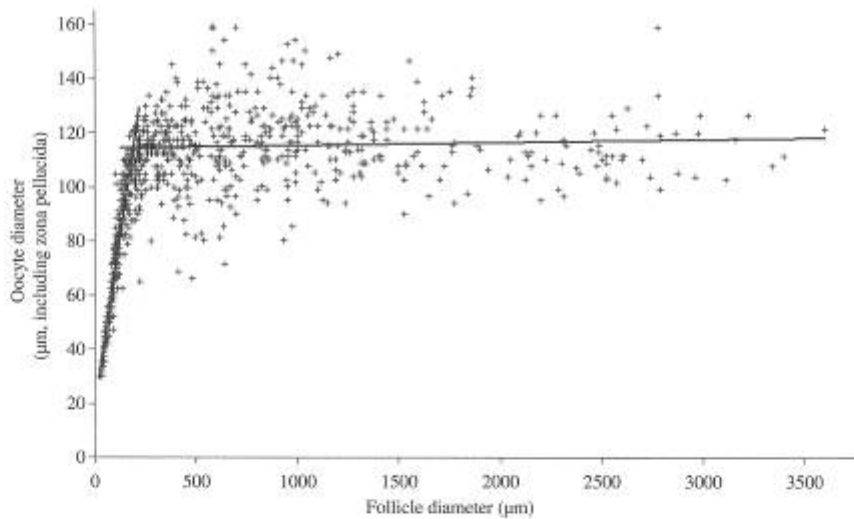


Fig. 4. Follicle and oocyte growth during feline folliculogenesis. Diameters were measured in 832 follicle/oocyte pairs

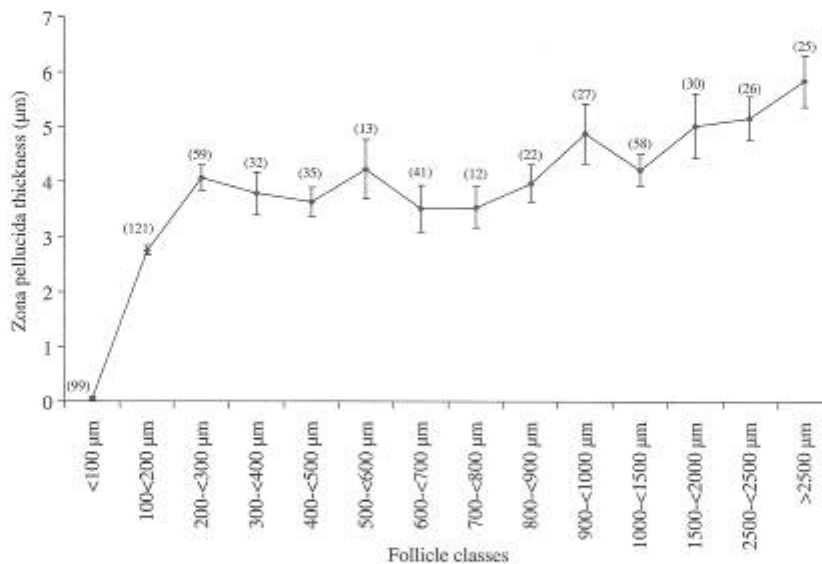


Fig. 5. Zona pellucida thickness throughout feline folliculogenesis ($n = 600$ oocytes)

(Table 1). No ZP was measurable in oocytes from follicles $< 90 \mu\text{m}$ ($n = 82$), whereas all oocytes originating from follicles $> 110 \mu\text{m}$ were surrounded by a ZP. The thickness of ZP has been evaluated in 600 oocytes. The progression of ZP thickness in relation with follicle diameter is reported in Fig. 5. This thickness increased quite rapidly from 0 to approximately $4 \mu\text{m}$ around oocytes from follicles until $300 \mu\text{m}$ ($y = 0.023x - 1.007$, $r^2 = 0.67$, with $x =$ oocyte diameter and $y =$ ZP thickness). In larger follicles, the ZP growth curve tapered off, like the growth curve of the oocyte ($y = 0.001x + 3.368$, $r^2 = 0.07$). The ZP reached approximately $6 \mu\text{m}$ in thickness in follicles

$> 2500 \mu\text{m}$. Altogether, ZP thickness proved to be variable in all classes of follicle, even in large mature follicles. For example, the range was from 2.5 to $10.6 \mu\text{m}$ in follicles $> 2500 \mu\text{m}$.

Discussion

This study reports the progression of oocyte and follicle diameters throughout feline folliculogenesis on a large number of follicles/oocytes from ovarian reserve to the end of follicular growth. Primordial follicles had a mean diameter of $44.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$, as previously described ($40\text{--}50 \mu\text{m}$, Jewgenow 1998; $38.8 \mu\text{m}$, Barber et al. 2001). At

the primary stage (one layer of surrounding cuboidal cells), we observed 40–80 µm oocytes, which is slightly larger than the data reported by Bristol-Gould and Woodruff (2006); 30–50 µm). The secondary follicles, with oocytes surrounded by two-cell layers, have been measured at a mean diameter of 126 ± 2 µm, also slightly larger compared with the observation of Barber et al. (2001); 99 ± 29 µm). Early antral follicles were measured at a mean diameter of 223.8 ± 5 µm. Our observations complete the study previously reported by Jewgenow and Pitra (1993), who analysed follicle/oocyte growth in 100–280 µm follicles and described early antral follicles measuring 220–280 µm. In the present study, the ZP was first observed in secondary follicles, reached 5–6 µm at the pre-ovulatory stage, which is consistent with earlier observations by Jewgenow and Rudolph (2001) but different from those reported by Barber et al. (2001) who reported the appearance of the ZP at the primary stage and a thickness of 14 µm in tertiary follicles. In the largest antral follicles, mean oocyte diameter was approximately 115 µm, which is lower than observations reported by Goodrowe et al. (1988). This difference is likely to be attributable to tissues processing, because dehydration and paraffin embedding are known to induce 10–15% of tissue retraction (Iwadare et al. 1984).

As reported in other mammals (mouse: Brambell 1928; Peters 1969; cow: Fair et al. 1995; Wandji et al. 1996; human: Gougeon 1984; Gougeon and Chainy 1987), we observed in the cat the dynamics of oocyte and follicle growth characterized by a biphasic pattern: during the first phase, growth rates of follicles and oocyte were high, and correlated linearly and positively. After antrum formation, a second phase with a diverging pattern of growth of the follicles and the oocytes was observed, and follicle growth became predominant. Linear regression functions we used in this work are the same as have been described in an article on mouse and human folliculogenesis (Brambell 1928; Gougeon 1984).

The beginning of follicular fluid accumulation, i.e. the formation of antrum, was observed in follicles measuring between 160 and 200 µm in diameter. This was in the same range that one found in several other mammals, in which the antral cavity appears in follicles ranging in diameter from 100 to 400 µm (Gosden and Telfer 1987; de Smedt et al. 1994).

The association between the follicular diameter at antrum formation and the pre-ovulatory diameter differs between species. In human and bovine follicles, antrum formation occurs at 2% of the final ovulatory diameter (Motlik and Fulka 1986; Greenwald and Terranova 1988), whereas it appears at 4.5% in pigs (Motlik and Fulka 1986) and 15% in marmoset (Gilchrist et al. 1995). In the present study, we reported that in the cat ovary, the antrum forms in 160–200 µm follicles, which is 5% of the pre-ovulatory diameter (i.e. 3500–3600 µm, as described in this study and by Malandain et al. 2006).

At the point of antrum formation, we observed that feline oocytes had reached almost 90% of their final diameter, as in mouse oocytes (Sorensen and Wasserman 1976). This means that feline oocytes reach their

full size early during folliculogenesis, which pattern is different from that of the pig or cow (Motlik and Fulka 1986).

The association between antrum formation and meiotic competence of the oocyte varies from species to species. In the mouse and the marmoset, meiotic competence occurs concomitantly with antrum formation (Eppig and Schroeder 1989; Gilchrist et al. 1995). However, for several other species, this acquisition of nuclear competence is not strictly correlated with antrum appearance (for review, see Trounson et al. 2001) and occurs later during follicular development (goat: de Smedt et al. 1994; pig: Motlik and Fulka 1986).

In the cat, the moment of acquisition of nuclear and also cytoplasmic competence remains to be described and would be of interest for a better control of *in vitro* maturation and developmental rate. When oocytes were collected during the non-breeding season and originated from < 1000 µm follicles, 70–80% were able to resume meiosis and reach metaphase II stage (Comizzoli et al. 2003). Furthermore, Otoi et al. (2001) tested the meiotic competence of < 100 µm, 100–110, 110–120 and > 120 µm oocytes (measured without ZP) but failed to detect any significant difference between these oocyte classes. It means that appearance of nuclear competence occurs earlier, in oocytes < 100 (approximately 110 µm with ZP). In our study, oocytes from early antral follicles measured 108.1 ± 1.6 µm. As a consequence, observations of both previous and present data suggest that cat oocytes may be meiotically competent just after antrum formation during folliculogenesis, in small antral follicles (200–300 µm). Taken together, the results of the present study provide a complete description of oocyte and follicle growth curves, identify the moment of antrum formation and describe the dynamics of oocyte growth.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Dr Andrew Ponter and Dr Marc Chodkiewicz for careful review of the manuscript. We also thank Dr Jean-Marie Mailhae, Dr Pascal Fayolle and all the internship students, from the department of Surgery and Dr Elise Malandain for providing feline ovaries.

References

- Barber MR, Lee SM, Steffens WL, Ard M, Fayrer-Hosken RA, 2001: Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology* **55**, 1705–1717.
- Brambell FWR, 1928: The development and morphology of the gonads of the mouse. Part III: the growth of the follicles. *Proc R Soc Lond* **103**, 258–272.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK, 2006: Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* **66**, 5–13.
- Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenti BS, 2003: Overcoming poor *in vitro* nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. *Reproduction* **126**, 809–816.
- Eppig JJ, Schroeder AC, 1989: Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* **41**, 268–276.



- Fair T, Hyttel P, Greve T, 1995: Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* **42**, 437–442.
- Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK, 1995: Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol Reprod* **52**, 1234–1243.
- Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM, Wildt DE, 1988: Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* **39**, 355–372.
- Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE, 1989: Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and *in-vitro* fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 73–90.
- Gosden RG, Telfer E, 1987: Scaling of follicular sizes in mammalian ovaries. *J Zool Lond* **211**, 157–168.
- Gougeon A, 1984: Caractères qualitatifs et quantitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain adulte. *Contracept Fertil Sex* **12**, 527–535.
- Gougeon A, Chainy GB, 1987: Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil* **81**, 433–442.
- Greenwald GS, Terranova PF, 1988: Follicular selection and its control. In: Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New-York, pp. 387–445.
- Gunzel-Apel AR, Kawachi R, Nautrup CP, Hedrich HJ, 1998: Sonographic presentation of the physiologic ovarian function in the anovulatory and pseudopregnant cycle of the cat. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* **26**, 275–283.
- Iwadare T, Mori H, Ishiguro K, Takeishi M, 1984: Dimensional changes of tissues in the course of processing. *J Microsc* **136**, 323–327.
- Jewgenow K, 1998: Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology* **49**, 1567–1577.
- Jewgenow K, Pitra C, 1993: Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology* **39**, 527–535.
- Jewgenow K, Rudolph M, 2001: Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats – an ultrastructural immunohistological investigation. *J Reprod Fertil Suppl* **57**, 23–29.
- Malandain E, Rault D, Froment E, Baudon S, Begon D, Chastant-Maillard S, 2006: Follicular growth and ovulation in the queen. *Bull Acad Vet France* **159**, 113–121.
- Motlik J, Fulka J, 1986: Factors affecting meiotic competence of pig oocytes. *Theriogenology* **25**, 87–96.
- Otoi T, Murakami M, Ooka A, Karja NW, Suzuki T, 2001: Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet Rec* **148**, 116–118.
- Pedersen T, Peters H, 1968: Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* **17**, 555–557.
- Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenthil B, Howard J, 2006: Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* **66**, 37–48.
- Peters H, 1969: The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol (Copenh)* **62**, 98–116.
- Purswell BJ, Kolster KA, 2006: Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology* **66**, 510–513.
- Shille VM, Lundstrom KE, Stabenfeldt GH, 1979: Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol Reprod* **21**, 953–963.
- de Smedt V, Crozet N, Gall L, 1994: Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J Exp Zool* **269**, 128–139.
- Sorensen RA, Wassarman PM, 1976: Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol* **50**, 531–536.
- Telfer E, Gosden RG, 1987: A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* **81**, 137–147.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G, 2001: Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction* **121**, 51–75.
- Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE, 1996: Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* **55**, 942–948.
- Wildt DE, Chan SY, Seager SW, Chakraborty PK, 1981: Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod* **25**, 15–28.

Submitted: 03 Sep 2007

Author's address (for correspondence): Karine Reynaud, UMR 1198 INRA/ENVA/CNRS_{PRE} Biologie du Développement et Reproduction, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France. E-mail: kreynaud@vet-alfort.fr

ETUDE MORPHOMETRIQUE DE LA FOLLICULOGENESE DANS L'ESPECE FELINE

NOM et Prénom : GICQUEL Coralie

Résumé :

Les techniques de reproduction assistée se sont considérablement développées ces vingt dernières années chez les félinés. Pourtant la dynamique de la croissance folliculaire et ovocytaire a fait l'objet de très peu d'études dans ces espèces. Le but de cette étude était la description quantitative (morphométrie) et qualitative (différenciation histologique) de la croissance folliculaire et ovocytaire dans l'espèce féline. Les ovaires issus de 43 chattes ont été collectés, inclus en paraffine et les coupes histologiques ont été préparées en vue de leur observation. Les diamètres de 832 couples follicule/ovocyte ont été mesurés, en incluant ou non la zone pellucide (ZP). Les diamètres moyens des follicules primordiaux, primaires, secondaires, pré-antraux et antraux étaient respectivement de $44,3 \pm 0,85$, $86,2 \pm 1,8$, $126,0 \pm 2,2$, $155,6 \pm 2,9$, et $223,8 \pm 5,3$ μm . Une relation biphasique entre la croissance folliculaire et ovocytaire a été mise en évidence. Avant la formation de l'antrum, les diamètres du follicule (x) et de l'ovocyte (y) étaient positivement et linéairement corrélés ($y = 0,500x + 20,01$, $r^2 = 0,89$, $P < 0,0001$). L'antrum apparaissait lorsque le follicule atteignait un diamètre de 160-200 μm (pour un diamètre ovocytaire de 102 μm). Après la formation de l'antrum, la croissance de l'ovocyte était presque nulle, alors que le follicule présentait un développement important ($y = 0,001x + 114,39$, $r^2 = 0,01$, $P = 0,20$). Le diamètre du follicule pré-ovulatoire était d'environ 3 500 μm et le diamètre ovocytaire maximal atteignait 115 μm . La ZP, absente dans les follicules primordiaux et primaires, apparaissait au stade secondaire et atteignait une épaisseur de 6 μm au stade pré-ovulatoire. Ces résultats suggèrent que (i) chez la chatte, la cinétique de la croissance folliculaire et ovocytaire est similaire à celle observée chez les autres mammifères ; (ii) l'antrum apparaît pour un diamètre folliculaire de 160-200 μm et (iii) l'ovocyte a achevé 90 % de sa croissance lors de la formation de l'antrum.

Mots clés :

FOLLICULE - OVOCYTE - HISTOLOGIE - ZONE PELLUCIDE - ANTRUM -
CARNIVORE - CHAT

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. CHASTANT-MAILLARD S.

Assesseur : Dr. BERNEX F.

Invitée : Dr. REYNAUD K.

Adresse de l'auteur :

4, cité de la Roquette
75011 Paris

MORPHOMETRIC APPROACH TO FOLLICULOGENESIS IN CATS

AUTHOR : GICQUEL Coralie

Summary :

Assisted reproductive technology in cats has made considerable progress over the last twenty years. However, follicle and oocyte growth kinetics in cats have been given little attention. This study was designed to describe, both quantitatively (morphometry) and qualitatively (histological differentiation), follicle and oocyte growth in the feline ovary. The ovaries of 43 cats were collected and processed for histology. The diameters of 832 follicle/oocyte pairs were measured, with and without zona pellucida (ZP), and special emphasis was given to the study of early folliculogenesis. Average primordial, primary, secondary, pre-antral and early antral follicles diameters were measured and found to be $44,3 \pm 0,85$, $86,2 \pm 1,8$, $126,0 \pm 2,2$, $155,6 \pm 2,9$ and $223,8 \pm 5,3$ μm respectively. A biphasic pattern of follicle and oocyte growth was observed. Before antrum formation, follicle (x) and oocyte (y) sizes were positively and linearly correlated ($y = 0,500x + 20,01$, $r^2 = 0,89$, $P < 0,0001$). Antrum formation occurred when the follicle reached 160-200 μm in diameter (while the oocyte was 102 μm). After antrum formation, a decoupling was observed, with a minimal increase in oocyte size contrasting with a significant follicle development ($y = 0,001x + 114,39$, $r^2 = 0,01$, $P = 0,20$). The pre-ovulatory follicle diameter was approximately 3 500 μm and the maximal oocyte diameter was 115 μm . The ZP, absent in primordial and primary follicles, appeared at the secondary stage and reached almost 6 μm at the pre-ovulatory stage. These results suggest that (i) in the feline ovary, the growth pattern of follicles and oocytes is similar to that observed in other mammals ; (ii) the antrum forms in 160-200 μm follicles, which represents 5 % of the pre-ovulatory diameter and (iii) the oocyte has achieved more than 90 % of its maximal growth at the stage of antrum formation.

Keywords :

FOLLICLE - OOCYTE - HISTOLOGY - ZONA PELLUCIDA - ANTRUM - CARNIVORE
- CAT

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. CHASTANT-MAILLARD S.

Assessor : Dr. BERNEX F.

Guest : Dr. REYNAUD K.

Author's address :

4, cité de la Roquette
75011 Paris