ACQUISITION PAR L'OVOCYTE DE LAPINE ET DE VEAU DU FACTEUR DE DÉCONDENSATION DU NOYAU DU SPERMATOZOÏDE FÉCONDANT (MPGF)

C. THIBAULT, Micheline GERARD et Y. MENEZO (1)

Station de Physiologie animale et Université de Paris VI,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas

RÉSUMÉ

La reprise complète de la méiose a été obtenue dans des ovocytes entourés des cellules du cumulus en culture. Ces ovocytes proviennent soit de follicules préovulatoires de Lapine, soit de follicules de taille moyenne (1,5 à 4,9 mm) de Veaux femelles de 3 à 4 mois.

Dans ces conditions le MPGF n'est jamais présent dans l'ovocyte.

Seules de toutes les hormones utilisées dans les cultures, la prolactine et la testostérone facilitent la transformation du noyau du spermatozoïde en un pronucléus mâle dans le quart des ovocytes. Il semble que cette action soit plus pharmacologique que physiologique.

Par contre, la culture de follicules entiers de Lapine, jusqu'à la thèque interne, en présence de gonadotropines, permet *in vitro* l'acquisition du MPGF par l'ovocyte qui peut être fécondé normalement et poursuivre un développement embryonnaire conduisant à des jeunes normaux.

La culture de follicules immatures de Veaux permet une reprise de la méiose dans les 3/4 des ovocytes, mais dans 35 p. 100 de ces ovocytes, elle s'arrête à la première division réductionnelle, tandis que les cellules du cumulus ne présentent pas la réaction de dissociation qui caractérise l'action des gonadotropines *in vivo*. Cultivées hors du follicule, ces mêmes cellules répondent aux gonadotropines. Le follicule immature est donc, soit imperméable aux gonadotropines, soit capable d'inhiber leur action.

Chez les Mammifères sous l'action du pic de gonadotropines, la maturation finale de l'ovocyte avant l'ovulation s'effectue toujours dans un follicule qui atteint sa taille maximum à la fois par multiplication cellulaire et sécrétion active des cellules de la granulosa. L'aptitude à sécréter différents stéroïdes sous l'action de LH *in vitro* évolue au cours du cycle (SEAMARK, MOOR et McINTOSH, 1974) et le follicule préovulatoire, au moment même où se produit la maturation de l'ovocyte, montre presque toujours une montée temporaire de la sécrétion d'estradiol, des androgènes et des progestines avant de se transformer en corps jaune.

(1) Biologie animale, I. N. S. A., 69621 Villeurbanne.

Chez les Amphibiens (SMITH, ECKER et SUBTELNY, 1968 ; SCHUETZ, 1972) et des Poissons (JALABERT et FOSTIER, 1974), les progestines sont nécessaires à la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

In vitro, chez les Mammifères, la reprise de la méiose ne nécessite l'intervention d'aucune hormone ; elle est régulièrement obtenue simplement en soustrayant l'ovocyte et ses cellules attenantes du cumulus, à l'action répressive de la granulosa (FOOTE et THIBAUT, 1969 ; TSAFRIRI et CHANNING, 1975).

Nous avons même montré, chez la Lapine, que la chronologie de l'apparition des divisions méiotiques allant jusqu'à l'émission du premier globule polaire, était absolument parallèle *in vivo*, sous l'action des gonadotropines et *in vitro* sans aucun apport hormonal, la totalité des ovocytes atteignant la métaphase II en 9 heures environ (THIBAUT, 1972 ; THIBAUT et GERARD, 1971, 1973). Pour cet aspect de sa maturation nucléaire, l'ovocyte de Mammifère n'apparaît donc pas contrôlé de la même manière par les gonadotropines et les stéroïdes que l'ovocyte des Vertébrés inférieurs.

Mais, par ailleurs, nous avons découvert que les ovocytes de Lapine ayant accompli leur maturation nucléaire *in vitro*, bien que fécondables, sont inaptes à assurer la transformation très rapide du noyau condensé du spermatozoïde en un noyau somatique banal, le pronucleus mâle, ce qu'ont confirmé MOTLIK et FULKA (1974 b).

Rappelons que cette transformation se manifeste morphologiquement par un gonflement très rapide de la tête du spermatozoïde dès qu'ont fusionné les membranes des gamètes, histochimiquement par la transformation des protéines nucléaires du spermatozoïde, visualisée par la perte de l'arginine (KOPECNÝ et PAVLOK, 1975), et fonctionnellement par la possibilité de replication de l'ADN qui se produit quelques heures plus tard (OPRESCU et THIBAUT, 1964).

Nous avons appelé MPGF le ou les facteurs présents dans le cytoplasme de l'ovocyte, qui assurent normalement ces transformations (THIBAUT, 1972).

L'existence du MPGF paraît être un phénomène général, puisque l'absence d'évolution de la tête spermatique dans des ovocytes maturés *in vitro* a été retrouvée pour l'ovocyte de la Truie (MOTLIK et FULKA, 1974 a) l'ovocyte humain (SOUPART, 1975), et par nous-mêmes dans le présent travail, pour l'ovocyte de Vache.

Nous avons cherché, dans des systèmes totalement *in vitro*, à obtenir la maturation complète de l'ovocyte, incluant la présence du MPGF dans l'ovocyte cultivé, soit seulement entouré de ses cellules périovocytaires, soit à l'intérieur de follicules isolés de l'ovaire. Nous avons utilisé deux catégories de follicules et d'ovocytes : chez la Lapine les follicules préovulatoires, c'est-à-dire ceux qui peuvent répondre par une ovulation à l'action des gonadotropines, et chez le Veau, les nombreux follicules présents dans l'ovaire de l'animal impubère.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les techniques de préparation des ovocytes et des follicules ont été décrites précédemment pour la Lapine (THIBAUT et GERARD, 1973).

Pour le Veau, l'animal est soumis avant abattage, à un prétraitement combinant l'action d'un progestatif, l'acétate de fluorogestone pendant 4 jours et de 3 000 U.I de PMSG administrée 20 à 40 heures avant l'abattage. Ceci permet d'obtenir par animal plusieurs dizaines de follicules de 1,5 à 4,5 mm, ne présentant aucun signe d'atrésie, ni aucune activation folliculaire résultant

de décharges endogènes de gonadotropines (ARRAU, 1974 ; THIBAUT, 1974). Lors de la préparation, les follicules atrétiques se reconnaissent à une vascularisation faible leur donnant un aspect grisâtre et à la présence de débris cellulaires visibles par transparence dans le liquide folliculaire. Ils sont ainsi aisément éliminés.

Les follicules sont nettoyés des cellules interstitielles et de tout ou partie de la thèque externe. Ils sont placés en culture organotypique sur grille et millipore et le milieu (1 ml) est changé toutes les 24 heures.

Après de nombreux essais, il est apparu que la stimulation du métabolisme des follicules par les gonadotropines et par la mise en culture entraînait une acidose interne, conduisant à l'atrésie, qu'il n'a été possible de compenser qu'en appauvrissant le milieu de culture par réduction ou suppression du sérum homologe, en augmentant son pouvoir tampon, en utilisant un pH élevé, compris entre 7,8 et 8,0 et en augmentant l'apport d'oxygène.

Nous utilisons les milieux suivants :

Milieu A : TC 199 (Earle), 70 parties, enrichi en pyruvate de Na à 15 g/l, 5 parties, en potassium (bicarbonate, 14 g/l, 10 parties et additionné de sérum de Veau et de sérum de Veau fœtal en quantités égales, 10 parties.

Le pyruvate et le potassium ont été ajoutés pour tenir compte de la composition du liquide folliculaire préovulatoire de Vache. Le rapport Na/K est plus faible que dans les milieux conventionnels où il est voisin de celui du sérum.

Placé sous un mélange gazeux contenant soit 20, soit 57 p. 100 d'oxygène, 75 ou 38 p. 100 d'azote et 5 p. 100 de gaz carbonique, le pH de ce milieu est voisin de 7,8. L'osmolarité est de 285-290 milliosmoles.

Milieu B : (tabl. 1) La composition en aminoacides est identique à celle du liquide folliculaire (MENEZO et TESTART, 1975). A l'exception de la glutamine et de la glycine, la concentration des différents aminoacides est plus faible que celle du milieu A.

Les protéines du milieu A sont remplacées par de l'albumine sérique, à la concentration de 10 g/l, qui ne contient aucun contaminant protéique ou minéral.

Le milieu ne renferme, à l'exception de la vitamine C, aucune autre vitamine. Il ne contient ni nucléotides, ni bases puriques et pyrimidiques.

Les concentrations en glucose, pyruvate, lactate et le rapport Na/K sont équivalents à ceux du milieu A. L'osmolarité et les pouvoirs tampons sont voisins.

TABLEAU I

Milieu de culture B
(en mg/100 ml)

BSA	1 000	Acétate de Na	5	Glutamine	15
NaCl	525	Pyruvate de Na	25	Glycine	60
NaHCO ₃	250	Lactate de Ca	50	Tween 80	5
KCl	80	Glucose	100	Cholestérol	12,5
		Vitamine C	5		

Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄ (*id.* TC 199).

Aminoacides : cf. MENEZO et TESTART (1975).

pH : 7,6-7,8. Osmolarité : 0,288.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. — *Maturation in vitro de l'ovocyte de Veau isolé*

Cultivé sans hormone ou en présence de FSH, LH et estradiol-17 β , pendant 23 à 30 heures, dans notre milieu A, les ovocytes de Veau provenant de follicules de 1,5 à 4,5 mm de diamètre reprennent pratiquement tous leur méiose, le plus souvent

jusqu'à la métaphase II, que la teneur en oxygène du mélange gazeux soit de 5 ou de 20 p. 100 (tabl. 2). Le pourcentage très élevé d'ovocytes atteignant la métaphase II, 94 p. 100 dans ces expériences chez le Veau, 100 p. 100 avec l'ovocyte de Lapine adulte cultivé sans gonadotropines (THIBAUT, 1972), quelle que soit la tension d'oxygène, en présence ou non de gonadotropines, laisse planer un doute sur l'intérêt des études telles que celles de JAGIELLO *et al.* (1975) sur le rôle d'hormones ou de médiateurs sur la maturation nucléaire de l'ovocyte *in vitro*.

TABLEAU 2

Maturation in vitro de l'ovocyte de Veau (Milieu A)

Teneur en O ₂ (%)	Hormones	Nbre ovocytes	Métaphase	
			1	2
20	O	3	0	3
20	FSH ou LH	27	3	24
20	FSH, LH, E ₂ 17-β	38	2	36
5	FSH, LH, E ₂ 17-β	11	0	11
		79	5	74

Sous l'action des gonadotropines, les cellules périovocytaires se dissocient, donnant l'aspect caractéristique de *corona radiata* telle qu'elle apparaît *in vivo* quelques heures après la décharge ovulante.

Transplantés dans une Vache en estrus, accouplés dans les heures précédant le transfert, ces ovocytes se sont révélés fécondables, mais ne possèdent pas de MPGF comme le montrent le tableau 3 et la figure 1, puisque le noyau spermatique ne gonfle pas.

TABLEAU 3

*Veau. Fécondation in vivo d'ovocytes maturés in vitro
hors du follicule*

Nombre d'œufs récupérés	Non fécondés	Pronucleus mâle normal	Fécondés pas de MPGF
16	9	1 (1)	6

(1) Correspond à l'ovulation de la Vache receveuse.

Ces résultats confirment donc totalement ceux que nous avons obtenus chez la Lapine et les observations de MOTLIK et FULKA (1974 *a*) chez la Truie.

L'impossibilité d'obtenir la présence du MPGF dans les ovocytes accomplissant une maturation nucléaire normale *in vitro* nous a conduits à rechercher si ce facteur

est synthétisé par l'ovocyte sous l'influence d'hormones ou de médiateurs sécrétés par le follicule sous l'action des gonadotropines ou si, produit par le follicule, il passe dans l'ovocyte par l'intermédiaire du liquide folliculaire.

II. — Tentative d'induction du MPGF dans l'ovocyte de Lapine cultivé hors du follicule

Après la décharge ovulante se produit une élévation rapide des stéroïdes caractérisée par une montée du niveau de l'estradiol, de la 20 α -dihydroprogestérone et de la testostérone (HILLIARD et EATON, 1971 ; HILLIARD *et al.*, 1974). En outre, les hormones gonadotropes sont présentes à l'intérieur du follicule. Enfin, la décharge ovulante est accompagnée d'une décharge d'autres hormones, dont la prolactine.

Nous avons donc été conduits à rechercher *in vitro* si ces différentes hormones pouvaient induire l'élaboration du MPGF par l'ovocyte lui-même ou par les cellules périovocytaires (tabl. 4).

TABLEAU 4

*Essai d'induction du MPGF dans les ovocytes de Lapine in vitro.
État du noyau du spermatozoïde 4-5 heures après fécondation*

Hormones ajoutées au milieu	Nombre d'ovocytes en culture	Pourcentage d'ovocytes fécondés	Pourcentage des noyaux spermatiques suivant leur état			
			1	2	3	4
FSH $\pm$ LH.....	119	63	96	4	0	0
Progestérone	24	50	100	0	0	0
20 α OH Pg	20	80	100	0	0	0
E ₂ $\pm$ 20 α OH Pg	80	48	100	0	0	0
Cortisol $\pm$ (FSH + LH) ...	26	70	100	0	0	0
E ₂ + testostérone	30	57	60	30	10	0
Prolactine $\pm$ FSH + LH ...	117	60	50	50	0	0
E ₂ + test. + prolact. + FSH + LH	16	94	60	15	0	25
Liquide folliculaire.....	5	100	100	0	0	0
c AMP	5	60	100	0	0	0

1. Pas d'évolution du noyau spermatique ou seulement formation d'une membrane.
2. Début de décondensation du noyau spermatique.
3. Formation d'un pronucleus mâle, mais des fragments du noyau spermatique restent présents.
4. Pronucleus mâle normal.

Les hormones gonadotropes bien que provoquant la dissociation des cellules du cumulus, sont sans action.

L'estradiol et/ou la 20 α -dihydroprogestérone, la progestérone, le cortisol, l'AMP cyclique, sont également inefficaces.

Par contre, la présence de prolactine et de testostérone facilite la formation du pronucleus mâle. Toutefois, cette formation est rarement normale, car le pronucleus formé contient plus ou moins de fragments non décondensés du noyau spermatique.

Dans les rares cas où la décondensation a été complète, 4 à 5 heures après la fécondation (FSH, LH, P, T et E₂), l'aspect réticulé du pronucleus mâle, après fixation, ne correspond pas exactement à l'aspect habituel du pronucleus dans les œufs normaux.

L'attention doit être attirée sur le fait que la présence de la prolactine, associée à la testostérone, entraîne environ 30 p. 100 de parthénogenèse spontanée durant la reprise de la méiose, avec segmentation régulière, ce qui laisse penser que ces hormones agissent plus en modifiant la perméabilité de l'ovocyte qu'en stimulant une synthèse physiologique du MPGF. Cependant, en utilisant une séquence hormonale d'estradiol, puis de 17 α -OH-progestérone, SOUPART a obtenu le développement d'un pronucleus mâle dans les ovocytes humains maturés *in vitro* dans ces conditions (1974, 1975).

III. — Maturation intrafolliculaire *in vitro* de l'ovocyte de Lapine adulte

Le maintien en parfait état, en culture, du follicule préovulatoire de Lapine pendant au moins 24 heures, condition absolue pour rechercher une maturation normale de l'ovocyte sous l'effet des gonadotropines, nécessite une oxygénation convenable. Celle-ci a été obtenue, soit en utilisant l'air sous une pression de 5 à 10 kg, soit en utilisant un mélange gazeux contenant 55 p. 100 d'oxygène. Le tableau 5 montre la double nécessité des gonadotropines et d'une oxygénation convenable.

TABLEAU 5

État des follicules de Lapine après 24 h de culture

Pression ou 57 p. 100 O ₂	Sans gonado- tropines	Avec gonadotropines			
		EHC*	FSH	LH	FSH + LH
O	4/4 P	1/1 P		4/4 P	
+	4/4 P	5/6 S	3/3 S		8/8 S

P : picnotique ; S : sans signe d'atrésie.

* EHC : extrait hypophysaire de Cheval.

Dans ces conditions les ovocytes reprennent leur méiose et atteignent la métaphase II avec un retard de 1 à 2 heures environ par rapport à la maturation *in vivo* ce qui peut représenter le temps nécessaire à la pénétration des gonadotropines qui doivent atteindre le follicule par diffusion sans être véhiculées par le sang à l'intérieur de la thèque. Les cellules du cumulus se dissocient comme *in vivo* (fig. 3).

Les œufs maturés *in vitro* dans leur follicule possèdent le MPGF : l'action combinée de FSH et de LH permet d'obtenir une évolution du noyau spermatique absolument semblable à celle observée dans les ovocytes témoins normalement ovulés (THIBAUT et GERARD, 1973).

Deux Lapines ayant reçu de tels ovocytes, provenant de Lapines d'une autre

race, ont donné naissance à des Lapereaux mâles et femelles qui, conduits à l'état adulte, se sont reproduits (THIBAUT, GERARD et MENEZO, 1975).

La maturation dans le follicule préovulatoire est donc complète et normale *in vitro* en présence de gonadotropines.

IV. — Maturation intrafolliculaire *in vitro* de l'ovocyte de Veau

Chez les Mammifères à taux d'ovulation réduit, le nombre de follicules préovulatoires est faible et le but de techniques *in vitro* est précisément de pouvoir tenter d'utiliser des follicules de taille plus petite pour l'obtention d'un nombre élevé d'ovocytes normaux et fécondables. L'animal impubère présente l'avantage de posséder une population folliculaire beaucoup plus importante que l'adulte. C'est pourquoi nous avons utilisé le Veau de 3-4 mois. Le tableau 6 résume nos résultats.

TABLEAU 6

Cultures de follicules de Veau de 1,5 à 4,9 mm
(Durée de culture 48 heures)

Milieux de culture	Nbre de follicules	Granulosa		Cumulus		État nucléaire			M I + M II (%)	M II (%)
		pica.	mit.	pica.	mit.	D.-RM	M I	M II		
A ou B	10	0-3/2	+ / 0	0-3/2	+ / 0	6	3	1	40	10
A ou B + I	25	0-2/1	+	0	+	21	3	0	14	0
AE ± I	10	0-2-3	+ / 0	0-1	+ / 0	6	4	0	40	0
A ou B + GE	37	0-3	+ / 0	0-1	+ / 0	14	11	12	62	32
A ou B + GI	15	0	+	0	+	1	9	5	95	33
A ou B + GEI	47	0-1	+	0	+	7	19	21	85	45

Milieu A ou B, voir Matériel et méthodes.

G : oFSH et oLH : 1 µg/ml chacun ; E : Estradiol-17β : 100 ng/ml

I : Insuline : 1 µg/ml ; Gaz : 57 p. 100 O₂ + 38 p. 100 N₂ + 5 p. 100 CO₂.

État de picnose : 0 : pas de cellules picnotiques ; 1 : quelques cellules picnotiques disséminées dans le tissu ; 2 : beaucoup de cellules picnotiques parmi les cellules saines ; 3 : toutes les cellules sont picnotiques, dans au moins une région du follicule

Sans apport de gonadotropines, dans les milieux A ou B, la majorité des follicules présentent après 48 heures, des cellules picnotiques. Dans une échelle où 0 figure l'absence complète de cellules picnotiques, la valeur la plus fréquente est 2. Cependant, quelques follicules demeurent complètement sains. Cette dégénérescence s'accompagne parfois d'une reprise de la méiose.

L'estradiol ajouté au milieu n'a aucun effet bénéfique sur l'état des cellules folliculaires : on observe également des cellules de la granulosa en voie de dégénérescence, ce qui se traduit également par une reprise spontanée de la méiose.

L'addition d'insuline améliore la survie des follicules et surtout permet le maintien d'une activité mitotique importante.

Comme pour le follicule de Lapine, l'addition de gonadotropines dans les milieux, avec ou sans insuline, avec ou sans estradiol, permet la préservation complète de toutes les assises cellulaires et une reprise physiologique de la méiose : sur 99 follicules cultivés 48 heures, 77 p. 100 ont repris leur méiose, dont plus de la moitié atteignent le stade final normal de la métaphase II.

Le tableau 6 paraît mettre en évidence un effet favorable de l'insuline sur l'activité mitotique, sur le pourcentage d'ovocytes reprenant leur méiose (de 85 à 95 p. 100 contre 62 p. 100 sans insuline) et probablement sur le pourcentage d'ovocytes atteignant la métaphase II. Il n'apparaît aucun effet favorable de l'estradiol. Des conclusions définitives ne pourront être tirées que sur un plus grand nombre de cultures.

Le problème important que soulève cette étude est la proportion relativement faible des ovocytes qui atteignent la métaphase II après 48 heures (de 32 à 45 p. 100).

Pour les follicules étudiés, dont la taille a varié de 1,2 à 4,9 mm (70 p. 100 se situant entre 2 et 3 mm) nous n'avons pas trouvé de relation entre leur taille et la reprise plus ou moins complète de la méiose. Or, les ovocytes de follicules semblables reprennent pratiquement tous leur méiose (tabl. 2) quand ils sont cultivés hors de leur follicule. Cette absence de réponse suggère soit une imperméabilité du follicule immature aux gonadotropines, soit le maintien d'un contrôle par la granulosa de l'activité des cellules du cumulus dans le follicule immature. Effectivement, on constate que la réaction caractéristique de dissociation des cellules du cumulus sous l'influence des gonadotropines, qui a lieu si on les cultive hors du follicule, ne se produit pratiquement pas à l'intérieur de celui-ci, (fig. 4). Si la non-dissociation des cellules du cumulus peut rendre compte de l'absence de reprise de la méiose, en l'état actuel de nos connaissances elle ne peut expliquer l'arrêt des divisions réductionnelles en métaphase I. L'arrêt en métaphase I a été rapporté pour des ovocytes de Souris en culture (DONAHUE, 1968) et HAIDRI, MILLER et GWATKIN (1971) et GWATKIN et HAIDRI (1974) ont montré, pour la Souris et le Hamster, que la proportion d'ovocytes atteignant *in vitro* la métaphase II, diminue quand la tension d'oxygène s'élève au-dessus de 5-10 p. 100. Il est possible que la proportion de 57 p. 100 d'oxygène du mélange gazeux qui s'est avéré nécessaire pour assurer la survie des cellules de la granulosa et du cumulus, soit trop élevée pour la maturation nucléaire complète de l'ovocyte.

*Colloque D. G. R. S. T., Biologie de la Procréation,
Paris, 7-8 mars 1975.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide de la D. G. R. S. T. (contrat n° 74-7-0514). Nous remercions M. CHESNÉ, M. du MESNIL du BUISSON, M^{lle} Catherine STOUR et M. TESTART pour l'aide apportée dans le travail réalisé avec les Veaux.

SUMMARY

IN VITRO ACQUIRED ABILITY OF RABBIT
AND COW OOCYTE TO ENSURE SPERM NUCLEUS
DECONDENSATION DURING FERTILIZATION (MPGF)

Complete nuclear maturation of oocytes taken from rabbit and calf follicles may be generally obtained *in vitro*, even when the oocytes are from medium-size follicles. However, neither calf nor rabbit oocytes matured this way have MPGF, the factor transforming the sperm nucleus into the male pronucleus.

The culture of cumulus-clothed oocytes in presence of different hormones or mediators give the following results.

Progesterone, 20 α -dihydroprogesterone, 17 β -estradiol, cortisol and the two gonadotropins are all without effect ; after culture in presence of prolactin, as well as testosterone, partial dissociation of the sperm nucleus occurs. When prolactin, testosterone, estradiol and gonadotropins are combined, 25 p. 100 of the oocytes form a subnormal male pronucleus.

When whole follicles of estrus rabbit are cultured in presence of FSH and LH, absolutely normal oocytes are obtained which have MPGF. These oocytes, transplanted into a host rabbit, give normal young.

Calf follicles survive and grow when cultured in modified TC 199, with 10 p. 100 of calf serum added, or in an entirely synthetic medium, with gonadotropins ; 77 p. 100 of the oocytes resume meiosis. However, for some unknown reason, only 32 to 45 p. 100 of them reach metaphase II, while 95 p. 100 of similar oocytes cultured outside of the follicles activate nuclear maturation. This incomplete oocyte maturation is accompanied, in the follicle, by non-dissociation of the cumulus cells which normally occur in presence of FSH *in vitro*.

The permeability of immature follicles to gonadotropins and the interaction of different cell types among themselves need for further studied.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARRAU J., 1974. Cinétique folliculaire et maturation ovocytaire chez le Veau traité par l'acétate de fluorogestone et la PMSG. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **14**, 633-650.
- DONAHUE R. P., 1968. Maturation of the mouse oocyte *in vitro*. I. Sequence and timing of nuclear progression. *J. exp. Zool.*, **189**, 237-244.
- FOOTE W. D., THIBAUT C., 1969. Recherches expérimentales sur la maturation *in vitro* des ovocytes de Truie et de Veau. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **9**, 329-349.
- GWATKIN R. B. L., HAIDRI A. A., 1974. Oxygen requirements for the maturation of Hamster oocytes. *J. Reprod. Fert.*, **37**, 127-130.
- HAIDRI A. A., MILLER I. M., GWATKIN R. B. L., 1971. Culture of mouse oocytes *in vitro*, using a system without oil or protein. *J. Reprod. Fert.*, **28**, 409-411.
- HILLIARD J., EATON L. W., 1971. Estradiol-17 β , progesterone and 20 α -hydroxypregn. 4 en - 3 one in rabbit ovarian plasma. II. From mating through implantation. *Endocrinology*, **89**, 522-527.
- HILLIARD J., PANG C. N., SCARAMUZZI R. J., PENARDI R., SAWYER C. H., 1974. Secretion rates of estradiol, testosterone and progesterone from right and left rabbit ovaries cannulated concurrently and successively. *Biol. Reprod.*, **10**, 364-369.
- JAGIELLO G., DUCAYEN M., MILLER W., GRAFFEO J., FANG F. S., 1975. Stimulation and inhibition with LH and other hormones of female mammalian meiosis *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **43**, 9-22.
- JALABERT B., FOSTIER A., 1974. Action of gonadotropin and steroid hormones on maturation of Trout oocytes *in vitro*. *Workshop on Oocyte maturation*, Bruxelles, Société belge de Biologie cellulaire.
- KOPECNY V., PAVLOK A., 1975. Autoradiographic study of mouse spermatozoan arginine-rich nuclear protein in fertilization. *J. exp. Zool.*, **191**, 85-95.
- MENEZO Y., TESTARD J., 1975. Étude comparée du sérum sanguin et du liquide folliculaire préovulatoire chez la Vache. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **15**, 1-8.
- MOTLIK J., FULKA J., 1974 a. Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **36**, 235-237.
- MOTLIK J., FULKA J., 1974 b. Fertilization and development *in vivo* of rabbit oocytes cultivated *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **40**, 183-186.

- OPRESCU S., THIBAUT C., 1965. Duplication de l'ADN dans les œufs de Lapine après la fécondation. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **5**, 151-156.
- SCHUETZ A. W., 1972. Hormones and follicular functions, 479-511, in : *Oogenesis*, BIGGERS J. and SCHUETZ A. W. ed. (University park Press, Baltimore).
- SEAMARK R. F., MOOR R. M., MCINTOSH J. E. A., 1974. Steroid hormone production by sheep ovarian follicles cultured *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **41**, 143-158.
- SMITH L. D., ECKER R. E., SUBTELNY S., 1968. *In vitro* induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles. *Develop. Biol.*, **17**, 627.
- SOUPART P., 1974. Fécondation humaine expérimentale : état de la question et perspective d'avenir. *Bruxelles médical*, **54**, 473-499.
- SOUPART P., 1975. *In vitro* maturation and fertilization of the human oocyte. In : *La Fécondation*, Thibault C. ed., Masson, Paris, 81-93.
- THIBAUT C., 1972. Final stages of mammalian oocyte maturation, 397-411, in : « *Oogenesis* », BIGGERS J. D. and SCHUETZ A. W. Ed. (University Park Press, Baltimore).
- THIBAUT C., 1974. Conditions de maturation normale de l'ovocyte de quelques Mammifères *in vivo* et *in vitro*. *Bruxelles médical*, **54**, 619-628.
- THIBAUT C., GERARD M., 1971. Maturation et fécondation *in vitro* de l'ovocyte de la Lapine, 12-25, in : *Malformations congénitales des Mammifères*, TUCHMANN-DUPLESSIS H. Ed. (Masson, Paris).
- THIBAUT C., GERARD M., 1973. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **13**, Hors série, 145-155.
- THIBAUT C., GERARD M., MENEZO Y., 1975. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.*, **45**, (sous presse).
- TSAFIRI A., CHANNING C., 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. *Endocrinology*, **96**, 922-927.

PLANCHE I

FIG. 1

Ovocyte de Veau, mûré *in vitro*, 5 heures après la fécondation *in vivo*. Absence de transformation du noyau du spermatozoïde.

FIG. 2

Fécondation normale d'un œuf de Vache, 5 heures environ après la pénétration du spermatozoïde, son noyau s'est transformé en un pronucleus mâle (le pronucleus femelle est partiellement visible contre le pronucleus mâle).

FIG. 3

Follicule de Lapine en estrus cultivé 12 heures *in vitro* en présence de FSH et de LH. La réaction de dissociation des cellules du cumulus est nette et le premier globule polaire a été émis.

FIG. 4

Follicule de Veau cultivé 48 heures en présence de gonadotropines. Le 2^e fuseau de maturation est visible, mais il n'y a pas de dissociation des cellules du cumulus qui ne se distinguent pas des cellules de la granulosa. Dans le coin droit en bas, partie de la thèque.