

Maturation ovocytaire, fécondation et développement embryonnaire chez la chienne

Canine oocyte maturation, fertilization and early embryonic development

Par Karine REYNAUD⁽¹⁾, Alain FONTBONNE⁽¹⁾⁽²⁾ Noël MARSELOO⁽¹⁾⁽²⁾,
Christine VIARIS DE LESEGNO⁽¹⁾, Sandra THOUMIRE⁽¹⁾ et Sylvie CHASTANT-MAILLARD⁽¹⁾⁽²⁾
(communication présentée le 17 février 2005)

RÉSUMÉ

Plusieurs aspects de la reproduction sont particuliers à l'espèce canine. D'une part, la folliculogénèse est singulière car chez la chienne, de nombreux follicules ovariens contiennent plusieurs ovocytes (follicules poly-ovocytaires). D'autre part, contrairement à ce qui est observé chez les autres femelles de mammifères, au moment de l'ovulation, l'ovocyte est encore à un stade immature (prophase I, stade vésicule germinative ou VG) et la maturation ovocytaire se poursuit ensuite dans l'oviducte. L'observation de ce phénomène est rendue complexe par le fait que l'ovocyte canin est riche en lipides et que son ADN est donc difficile à visualiser. *In vitro*, la fécondation d'ovocytes immatures a été observée mais *in vivo*, elle a lieu au moment où les ovocytes ont atteint le stade métaphase II, environ 50 h après l'ovulation. Les premiers pronoyaux sont présents 72 à 124 h après l'ovulation et les premiers embryons au stade 2-cellules sont observés 96 à 168 h après l'ovulation. La période de transit dans l'oviducte est longue et les embryons n'atteignent l'utérus qu'au stade morula ou jeune blastocyste, 10 à 12 jours après l'ovulation et l'implantation a ensuite lieu vers 18 à 21 jours.

Globalement, malgré toutes ces particularités, les recherches sur la reproduction dans l'espèce canine étaient jusqu'alors essentiellement cliniques. Les travaux visent maintenant à améliorer les connaissances fondamentales, notamment concernant les mécanismes contrôlant la maturation ovocytaire *in vivo*, pour pouvoir ensuite améliorer les rendements de la maturation *in vitro*, actuellement très faibles.

Mots clés : chienne, ovocyte, fécondation, embryon.

SUMMARY

Canine reproduction has several distinctive features. Firstly, folliculogenesis is unusual as numerous ovarian follicles contain several oocytes (polyovular follicles). Secondly, unlike in other mammalian species, oocytes at the time of ovulation are still at an immature stage (prophase I, germinal vesicle stage), and complete their maturation in the oviduct. This phenomenon is not easy to observe because the canine oocyte has a high lipid content and its DNA is difficult to visualise. Fertilization of immature oocytes has been observed in vitro, however in vivo, fertilization occurs in oocytes at the metaphase II stage, approximately 50 hours after ovulation. The 2-pronuclei stage is reached 72-124 hours after ovulation, and 2-cell embryos are present 96-168 hours after ovulation. The oviductal phase is long and embryos enter the uterine cavity at the morula or early blastocyst stage 10-12 days following ovulation. Implantation occurs 18 to 21 days after ovulation.

In spite of all these specificities, studies on canine reproduction were so far mainly clinical. However, current research is focusing on fundamental knowledge, namely the mechanisms controlling oocyte maturation in vivo, in the hope to improve the yield of oocyte maturation in vitro, which is still very low.

Key words : bitch, oocyte, fertilization, embryo.

* Correspondance : K. REYNAUD, UMR 1198 INRA / ENVA / CNRS Biologie du Développement et Reproduction, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort CEDEX, France. Tel : 01 43 96 70 97, Fax: 01 43 96 71 30, E-mail: kreynaud@vet-alfort.fr

(1) UMR 1198 INRA / ENVA / CNRS Biologie du Développement et Reproduction,

(2) UP Reproduction, CERCA (Centre d'Études en Reproduction des Carnivores)

• **LA CHIENNE... UN MODÈLE PHYSIOLOGIQUE PARTICULIER**

Sur le plan de la reproduction, la chienne est une espèce particulière par son endocrinologie, sa physiologie ovarienne, sa maturation ovocytaire et son développement embryonnaire.

La chienne est une espèce polyovulante, monoœstrale non saisonnée. Le cycle est divisé en 3 phases : la période des chaleurs (prœstrus et œstrus, d'environ 15 jours), le métœstrus (2 mois) et l'anœstrus (4 mois) (JOHNSTON, KUSTRITZ et OLSON, 2001). Contrairement à ce qui est observé chez la plupart des femelles de mammifères, une augmentation de la progestérone sérique est décelée quelques jours avant l'ovulation, avant même le pic préovulatoire de LH. Cette lutéinisation préovulatoire est caractéristique des Canidés. De plus, de nombreux follicules ovariens contiennent plusieurs ovocytes (follicules poly-ovocytaires). Tandis que ce type de follicules ne représente que 0,1 à 3 % de la population folliculaire chez la femme ou la souris et 4 % chez la chatte, on trouve jusqu'à 14 % de follicules poly-ovocytaires chez la chienne, contenant de 2 à 17 ovocytes (TELFER et GOSDEN 1987 ; MC DOUGALL *et al.*, 1997). Les mécanismes induisant cette mise en place folliculaire originale sont encore inconnus.

Un autre aspect concerne la maturation ovocytaire : chez la plupart des femelles de mammifères, suite au pic de LH préovulatoire, l'ovocyte, bloqué en prophase I, reprend sa méiose pour atteindre le stade métaphase II. A ce stade, l'ovulation a lieu et l'ovocyte est directement apte à la fécondation. Chez la chienne, par contre, malgré l'existence d'un pic de LH déclenchant l'ovulation, l'ovocyte est expulsé de son follicule à un stade diploïde encore immature, le stade vésicule germinative (VG); il complète sa maturation dans l'oviducte, durant 48 à 72 h (TSUTSUI 1989; FONTBONNE *et al.*, 2004). Enfin, après la fécondation, l'embryon reste pendant une longue période dans l'oviducte (8 à 10 jours au lieu de 3 à 4 jours chez les autres mammifères) et s'implante dans l'utérus 18 à 21 jours après l'ovulation.

• **MATURATION FOLLICULAIRE ET OVOCYTAIRE**

La maturation folliculaire terminale

Pendant la période d'anœstrus, il se produit une croissance folliculaire mais la différenciation folliculaire terminale n'a pas lieu et la taille maximale des petits follicules à antrum est de 0,5 à 1 mm (ANDERSEN ET SIMPSON, 1973). Au moment de l'entrée en chaleurs (prœstrus), de petits follicules mesurant de 1 à 1,5 mm de diamètre sont présents sur l'ovaire et commencent leur croissance terminale, atteignant 1,5 à 5 mm à la fin du prœstrus, alors que la concentration de progestérone sérique est inférieure à 1 ng/ml. Pendant la période d'œstrus, le diamètre des follicules augmente pour atteindre la taille préovulatoire, soit en moyenne 5 à 7 mm (ANDERSEN ET SIMPSON, 1973 ; CONCANNON, TSUTSUI et McENTEE, 1977 ; WALLACE *et al.*, 1992 ; ENGLAND et YAEGGER, 1993 ; HASE *et al.*, 2000 ; **figure 1, A-B**). Au moment de l'ovulation, le niveau de progestérone sérique est d'environ 6 ng/ml et le nombre d'ovu-

lations varie de $5,7 \pm 0,3$ (TSUTSUI et SHIMIZU, 1975) à $7,7 \pm 0,6$ (FONTBONNE *et al.*, 2004). L'ovulation de tous les follicules n'est pas un processus synchrone et ce phénomène peut durer pendant 36h (BOYD *et al.*, 1993). On ignore si les follicules poly-ovocytaires atteignent l'ovulation et si oui, s'ils expulsent plusieurs ovocytes ou un seul.

L'ovocyte pendant sa vie intra-ovarienne

Les recherches fondamentales portant sur les follicules et ovocytes préovulatoires sont encore rares chez la chienne car leur collecte est difficile : les chaleurs n'ont lieu que 2 fois dans l'année et il est difficile de les induire artificiellement ou d'induire une superovulation. De plus, il faut déterminer le stade préovulatoire par dosage de la progestérone sérique et éventuellement par échographie. Or, cette technique présente des difficultés : la bourse ovarique graisseuse entourant l'ovaire rend sa visualisation malaisée.

Une des caractéristiques de l'ovocyte canin est son cytoplasme très sombre, plus sombre encore que dans les espèces, telles que le porc, chez lesquelles de tels ovocytes sont classiquement décrits (**figure 1, C-D**). En effet, l'ovocyte est riche en gouttelettes lipidiques qui s'accumulent très tôt au cours de la folliculogénèse (TESORIERO, 1981). Comme chez les autres femelles de mammifères, au moment de l'ovulation, le pic de LH induit une mucification de la masse des cellules du cumulus entourant l'ovocyte. Cependant, les 2 couches directement au contact de la zone pellucide restent très compactes autour de l'ovocyte. Cette mucification incomplète pourrait expliquer que l'ovocyte canin ne reprend pas immédiatement sa méiose et est expulsé au stade immature VG. Il mesure alors 100 à 120 μm (ANDERSEN et SIMPSON, 1973 ; FONTBONNE *et al.*, 2004).

L'ovocyte pendant sa vie extra-ovarienne

Pendant la période péri-ovulatoire, la bourse ovarique contient 2 à 3 ml de liquide (TSUTSUI et EJIMA 1988 ; METCALFE, 1999) et l'ovocyte est expulsé de son follicule dans cette bourse et commence sa maturation extra-folliculaire. Deux aspects de cette maturation sont particuliers : d'une part, l'ovocyte complète sa méiose pendant son séjour dans l'oviducte et d'autre part, il reste viable, c'est-à-dire fécondable, pendant plusieurs jours, jusqu'à 108h après l'ovulation (TSUTSUI et SHIMIZU 1975), voire même 120 h, au lieu de 24 h au maximum chez les autres espèces.

Quelques heures après l'ovulation, les ovocytes sont regroupés dans l'oviducte et encore entourés de quelques couches denses de cellules de granulosa du cumulus (**figure 1 D**). Ces cellules restent étroitement liées à l'ovocyte, émettant de très nombreuses projections cellulaires qui traversent la zone pellucide et entrent en contact avec la membrane ovocytaire (**figure 1 E**). Il est probable que ces communications ovocyte-cumulus participent au contrôle de la méiose.

Peu d'études ont décrit l'évolution de l'ovocyte durant les premières heures suivant l'ovulation (TSUTSUI 1975a ; FONTBONNE *et al.*, 2004). Jusqu'à 48 h, les ovocytes sont tous au stade VG et se situent de la partie proximale à la par-

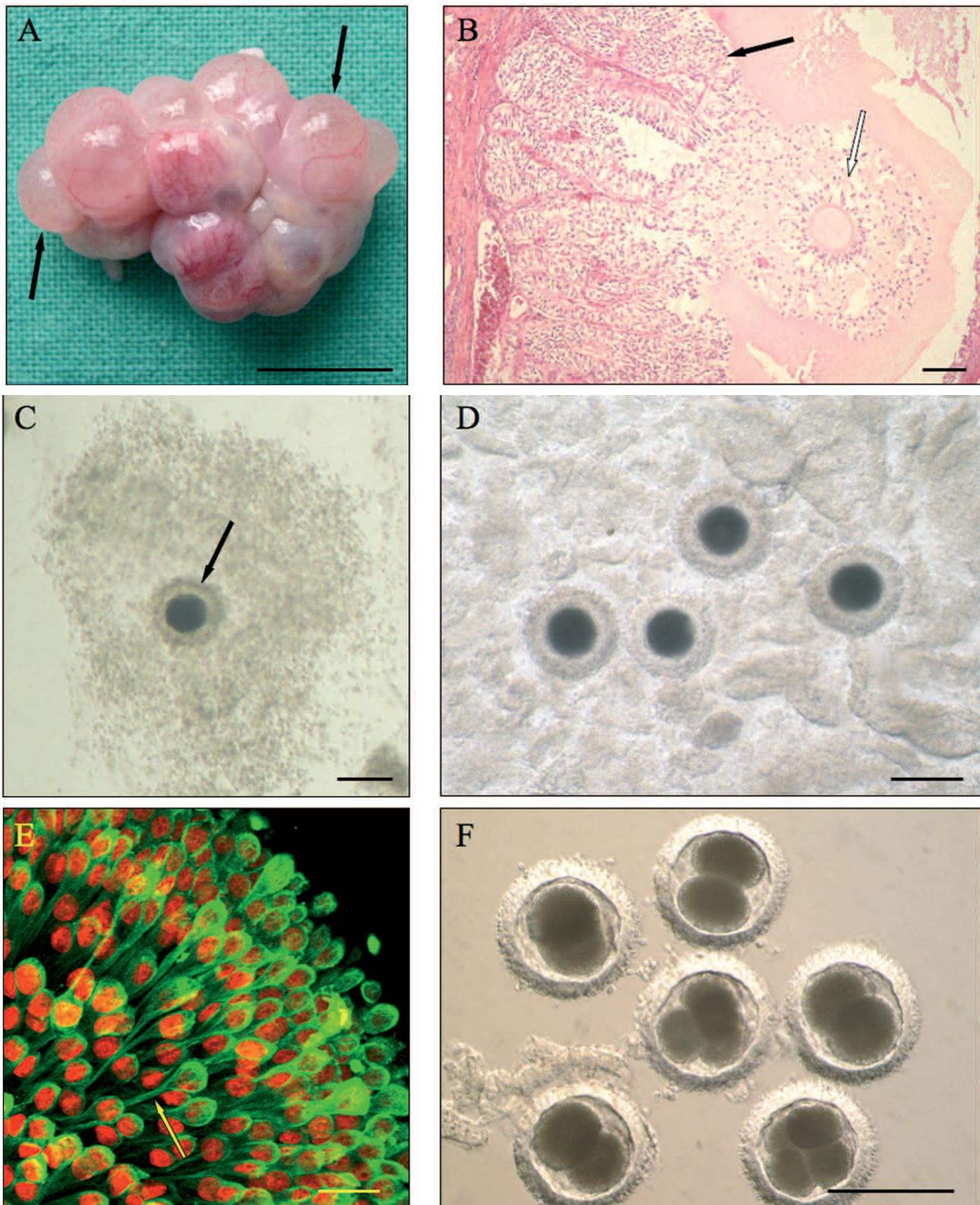


Figure 1: Sur l'ovaire canin au stade préovulatoire (A), plusieurs follicules de 5 à 7 mm sont présents (flèches). A ce stade, l'augmentation du niveau de progestérone circulant a induit une lutéinisation et un épaississement important des cellules de granulosa (flèche noire, B). Le pic de LH préovulatoire entraîne une mucification du cumulus (flèche blanche, B), également clairement visible autour de l'ovocyte après ponction du follicule (C) mais quelques couches de cellules restent néanmoins serrées autour de l'ovocyte (flèche). Ces cellules restent visibles autour des ovocytes collectés par rinçage des oviductes (35 h après ovulation, D). Elles semblent préserver leurs contacts directs avec l'ovocyte et une coloration de la tubuline et de l'ADN permet de visualiser les projections cellulaires (traversant la zone pellucide) de ces cellules de la granulosa (flèche jaune, E). Après fécondation, les cellules de la granulosa disparaissent peu à peu et le développement embryonnaire a lieu dans l'oviducte jusqu'au stade morula/jeune blastocyste (ici, embryons 2 à 4 cellules, collectés 112h après l'ovulation, F). L'échelle correspond à 1 cm (A), 100 μ m (B, C, D, F) et 20 μ m (E).

tie médiane de l'oviducte. Les premiers stades métaphase II ne sont observés que 54h après l'ovulation.

• FÉCONDATION

Survie des spermatozoïdes et de l'ovocyte

Les spermatozoïdes peuvent être observés dans l'oviducte dès les premières minutes après un accouplement (DOAK, HALL et DALE, 1967 ; ENGLAND, 2004). Leur nombre dans l'oviducte ou la bourse ovarique est cependant cent fois moins important que dans l'utérus. Les spermatozoïdes sont capables de survivre entre 3,5 et 6 jours après l'accouplement et certains peuvent même être encore retrouvés vivants 11 jours après (GRIFFITHS et AMOROSO, 1939 ; DOAK, HALL et DALE, 1967). Leur survie serait meilleure quand la chienne est saillie au moment des chaleurs que lorsqu'elle est en début de métrœstrus (une dizaine de jours après l'ovulation).

Malgré la longue durée de fécondabilité des ovocytes canins, lorsque des oviductes sont rincés 5 à 10 jours après l'ovulation, on observe des ovocytes non fécondés/dégénérés qui peuvent représenter jusqu'à 50 % des ovocytes/embryons collectés (TSUTSUI *et al.*, 2004 ; BYSTED *et al.*, 2001). Cette absence de fécondation, aux causes encore inconnues, pourrait être liée à la mauvaise qualité des ovocytes (zone pellucide anormale par exemple) ou à une maturation trop lente.

Fécondation *in vivo*

Chez la majorité des mammifères, l'ovocyte est au stade mature de métaphase II lorsqu'il est expulsé du follicule et la fécondation peut donc avoir lieu immédiatement. Chez la chienne, la pénétration d'un ovocyte ovulé à un stade immature par un spermatozoïde a été rapportée pour la première fois par VAN DER STRICHT (1923). Mais de nombreux auteurs ont décrit des fécondations d'ovocytes immatures *in vitro* (MAHI et YANAGIMACHI, 1976 ; YAMADA *et al.*, 1992 ; HAY *et al.*, 1994 ; SHIMAZU et NAITO, 1996 ; OTOI *et al.*, 2000), avec néanmoins un fort taux de polyspermie (6 à 59 %) et jusqu'à 12 spermatozoïdes par ovocyte (SAINT-DIZIER, RENARD et CHASTANT-MAILLARD, 2001). Nous avons recherché l'existence de ce phénomène *in vivo* et pour cela, nous avons suivi l'ovulation de plusieurs chiennes, inséminées avant et après l'ovulation. L'oviducte a été ensuite prélevé et rincé à différents moments après l'ovulation. Ces travaux ont révélé que la fécondation d'un ovocyte immature demeurerait extrêmement rare : sur 112 ovocytes immatures observés dans les oviductes de 30 chiennes, prélevés de 17 à 127 h après l'ovulation, seuls trois ovocytes appartenant à une même chienne, étaient fécondés (FONTBONNE *et al.*, 2004).

La fécondation a donc lieu lorsque les ovocytes ont atteint leur stade de métaphase II dans l'oviducte, c'est-à-dire de 54 à 83 h après l'ovulation. Les premiers embryons au stade 2-pronoyaux sont généralement observés à partir de 72 h et sont dans la partie médiane-distale de l'oviducte (TSUTSUI, 1975a). Le taux global de fécondation suivie d'implantation est estimé en comparant le nombre de corps jaunes et celui de chiots nés :

il est en moyenne de 78 à 88 % mais peut varier considérablement de 17 à 100 % selon les chiennes (TSUTSUI 1975b ; TSUTSUI et EJIMA, 1988 ; SHIMIZU *et al.*, 1990).

• DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Quelques auteurs ont décrit le développement embryonnaire, à partir d'un nombre variable de chiennes, de 8 à 50 selon les études. L'estimation d'une chronologie de développement précise requiert de connaître très précisément le moment de l'ovulation. Pour cette raison, seules les études, en petit nombre, au cours desquelles l'ovulation a été détectée par des moyens fiables (détection du pic de LH, laparotomie, échographie), doivent être retenues.

Selon les cas, les ovocytes/embryons ont été collectés entre 17h (FONTBONNE *et al.*, 2004) et 20 jours après l'ovulation (HOLST et PHEMISTER, 1971). Pendant les 10 premiers jours post-ovulatoires, la collecte nécessite de disséquer l'oviducte avec précaution pour ensuite le rincer. Les embryons au stade 2-pronoyaux sont présents de 72 à 124 h après l'ovulation et les premiers embryons 2-cellules, de 96 à 168 h (TSUTSUI 1975a ; RENTON *et al.*, 1991 ; BYSTED *et al.*, 2001 ; FONTBONNE *et al.*, 2004 ; **figure 1 F**). À ce stade, les embryons mesurent de 110 à 170 µm (TSUTSUI 1975a ; ENGLAND, VERSTEGEN et HEWITT, 2001). La synchronisation du développement des embryons d'une même cohorte (TSUTSUI, 1989 ; RENTON *et al.*, 1991), décrite par certains auteurs, n'est pas systématiquement observée (BYSTED *et al.*, 2001 ; FONTBONNE *et al.*, 2004). Les embryons atteignent le stade 8-16 cellules de 112 à 288h (4,5-12 jours) après l'ovulation et ce stade correspond au moment de l'activation du génome embryonnaire (BYSTED et GREVE, 2000). Ils mesurent alors 188 à 200 µm (HOLST et PHEMISTER, 1971) et sont localisés dans la partie distale de l'oviducte.

Les premières morulae sont observées plus tard après l'ovulation (de 204 à 240 h, c'est-à-dire de 8,5 à 10 jours). Les embryons entrent dans la corne utérine à ce stade ou au stade « jeune blastocyste » à 10-12 jours (TSUTSUI, 1975a). La taille des embryons augmente alors rapidement ; elle est de 215 à 350 µm au stade jeune blastocyste, de 500 à 750 µm au stade blastocyste expansé, puis d'un millimètre au stade blastocyste tardif (HOLST et PHEMISTER, 1971 ; TSUTSUI *et al.*, 1989 ; RENTON *et al.*, 1991). La zone pellucide persiste pendant une longue période et le blastocyste, libre dans la cavité utérine, grandit encore jusqu'à 2,3 mm (HOLST et PHEMISTER, 1971).

Avant l'implantation, 12 à 17 jours après l'ovulation, une migration transutérine des embryons peut intervenir. Ce phénomène, décrit également chez la chatte et la truie, est observé chez près de 50 % des chiennes et a probablement pour rôle d'équilibrer le nombre de fœtus entre les deux cornes utérines quand le nombre de corps jaunes est très différent entre les deux ovaires (TSUTSUI 1975b ; SHIMIZU *et al.*, 1990).

Après cette migration, le blastocyste a atteint 2,5 mm et la zone pellucide qui s'était amincie, se rompt (HOLST et PHEMISTER, 1971 ; CONCANNON, TSUTSUI et

SHILLE, 2001). L'implantation a lieu ensuite 18 à 21 jours après l'ovulation.

Globalement, la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire dans l'espèce canine sont donc des processus de durée plus longue par rapport aux autres espèces, avec une reprise de la méiose nécessitant environ 50 h, un transit de 10 jours dans l'oviducte et un temps de vie libre des embryons de 20 jours environ.

• CONCLUSION

Durant ces trente dernières années, les recherches concernant la physiologie de la reproduction chez la chienne étaient surtout centrées sur les aspects endocriniens et les avancées cliniques. Les recherches actuelles visent maintenant à améliorer les connaissances fondamentales, notamment celles concernant les mécanismes contrôlant la maturation ovocytaire *in vivo*, pour ensuite pouvoir améliorer les rendements de la maturation *in vitro*, actuellement très faibles.

REMERCIEMENTS

Merci à l'équipe du Centre d'Etudes en Reproduction des Carnivores (CERCA) pour sa collaboration active, ainsi qu'à nos animaliers qui ont pris grand soin de nos animaux. Cet article n'aurait pas pu exister sans l'aide active de nos chiennes qui ont accepté les suivis de chaleurs, les échographies et les stérilisations. L'alimentation de nos animaux a été assurée par Royal Canin (Aimargues, France).

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSEN AC, SIMPSON ME (1973) *The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)*. Eds Geron-X, Inc., Los Altos, California, USA, 76-127
- BOYD JS, RENTON JP, HARVEY MJ, NICKSON DA, ECKERSALL PD, FERGUSON JM (1993) Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J.Reprod.Fertil., Suppl.*, **47**, 101-105.
- BYSTED BV, DIELEMAN SJ, HYTTEL P, GREVE T (2001) Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *J.Reprod.Fertil., Suppl.*, **57**, 181-186.
- BYSTED BV, GREVE T (2000) Activation of the embryonic genome in the dog. *Theriogenology*, **53**, 269.
- CONCANNON PW, HANSEL W, McENTEE K (1977) Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol.Reprod.*, **17**, 604-613.
- CONCANNON P, TSUTSUI T, SHILLE V (2001) Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J.Reprod.Fertil., Suppl.*, **57**, 169-179.
- DOAK RL, HALL A, DALE HE (1967) Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J.Reprod.Fertil.*, **13**, 51-58.
- ENGLAND GC (2004) Sperm transport within the reproductive tract of the bitch. *In* : Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, 4-6 août 2004, 30-31.
- ENGLAND GC, VERSTEGEN J, HEWITT DA (2001) Pregnancy following *in vitro* fertilisation of canine oocytes. *Vet.Rec.*, **148**, 20-22.
- ENGLAND GC, YAEGER AE (1993) Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during estrus, ovulation and early pregnancy. *J.Reprod.Fertil., Suppl.*, **47**, 107-117.
- FONTBONNE A, REYNAUD K, MARSELOO N, DUMASY M, CHASTANT-MAILLARD S (2004) *In vivo* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *In* : *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Sao Paulo, 4-6 août 2004, 144-146.
- GRIFFITHS WF, AMOROSO EG (1939) Proestrus, estrus, ovulation and mating in the greyhound bitches. *Vet.Rec.*, **51**, 1279-1284.
- HASE M, HORI T, KAWAKAMI E, TSUTSUI T (2000) Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J.Vet.Med.Sci.*, **62**, 243-248.
- HAY MA, KING WA, GARTLEY CJ, GOODROWE KL (1994) Influence of spermatozoa on *in vitro* nuclear maturation of canine ova. *Biol.Reprod.Suppl.*, **50**, 145.
- HOLST PA, PHEMISTER RD (1971) The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol.Reprod.*, **5**, 194-206.
- JOHNSTON SD, KUSTRITZ MV, OLSON PN (2001) *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia : WB Saunders, USA, 16-31.
- MAHI CA, YANAGIMACHI R (1976) Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J.Exp.Zool.*, **196**, 189-196.
- McDOUGALL 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.
- METCALFE S (1999) Assisted reproduction in the bitch. MSc Thesis, Monash University, Clayton, Australie.
- OTOI T, FUJII M, TANAKA M, OOKA A, SUZUKI T (2000) Oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology*, **54**, 535-542.
- RENTON JP, BOYD JS, ECKERSALL PD, FERGUSON JM, HARVEY MJ, MULLANEY J, PERRY B (1991) Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J.Reprod.Fertil.*, **93**, 221-231.
- SAINT-DIZIER M, RENARD JP, CHASTANT-MAILLARD S (2001) Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction*, **121**, 97-105.
- SHIMAZU Y, NAITO K (1996) Both male and female pronuclei formation in canine oocytes inseminated at germinal vesicle stage. *J.Mamm.Ova Res.*, **13**, 122-124.
- SHIMIZU T, TSUTSUI T, MURAO I, ORIMA H (1990) Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Jpn.J.Vet.Sci.*, **52**, 1273-1275.

- 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.
- TESORIERO JV (1981) Early ultra-structural changes of developing oocytes in the dog. *J.Morphol.*, **168**, 171-179.
- TSUTSUI T (1975a) Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *Jpn.J.Anim.Reprod.*, **21**, 70-75.
- TSUTSUI T (1975b) Ovulation rate and transuterine migration of the fertilized ova. *Jpn.J.Anim.Reprod.*, **21**, 98-101.
- TSUTSUI T (1989) Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J.Reprod.Fertil.Suppl.*, **39**, 269-275.
- TSUTSUI T, EJIMA H (1988) Experimental induction of superfecundation in the dog. *Jpn.J.Vet.Sci.*, **50**, 581-583.
- TSUTSUI T, HORI T, ENDO S, HAYAMA A, KAWAKAMI E (2004) Intrauterine transplantation of the early canine embryos. In : *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Sao Paulo, 4-6 août 2004, 271-273.
- TSUTSUI T, SHIMADA K, NISHI M, KUBO N, MURAO I, SHIMIZU T, OGASA A (1989) An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn.J.Vet.Sci.*, **51**, 797-800.
- TSUTSUI T, SHIMIZU T (1975) Studies on the reproduction in the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. *Jpn.J.Anim.Reprod.*, **21**, 65-69.
- VAN DER STRICHT (1923) Etude comparée des ovules de mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse. *Arch.Biol.*, **33**, 229-300.
- WALLACE SS, MAHAFFEY MB, MILLER DM, THOMPSON FN, CHAKRABORTY PK (1992) Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am.J.Vet.Res.*, **53**, 209-215.
- YAMADA S, SHIMAZU Y, KAWAJI H, NAKAZAWA M, NAITO K, TOYODA Y (1992) Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. *Biol.Reprod.*, **46**, 853-858.