

LA CULTURE *IN VITRO* DE L'ŒUF DE VACHE

C. THIBAUT

avec la collaboration technique de Anne-Marie MÉLIÈRES et Anne-Marie ESCAFFRE

*Station centrale de Physiologie animale,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas*

Les études sur la fécondation et l'embryologie expérimentales des Mammifères sont rendues très difficiles par la localisation obligatoire des œufs en des parties précises des trompes ou de l'utérus. Seule, la connaissance de milieux de culture apporte la solution satisfaisante à l'expérimentateur, et les beaux travaux récents d'embryologie expérimentale chez la Souris (BRINSTER, 1965 ; MINTZ, 1965 ; MULNARD, 1965 ; TARKOWSKI, 1965) n'ont été rendus possibles que par la découverte par HAMMOND (1949), par WHITTEN (1957), puis par BRINSTER (1963), de milieux permettant la segmentation normale de cet œuf *in vitro* jusqu'au stade préimplantatoire.

La possibilité de cultiver l'œuf des Ruminants offrirait, en outre, l'avantage d'une application éventuelle : des œufs tubaires fécondés, ou ovariens et fécondés *in vitro*, pourraient, après culture *in vitro* permettant leur contrôle et leur segmentation, être greffés dans les cornes utérines de femelles nourrices.

Chez les Ruminants, seuls les œufs de Brebis et de Chèvres ont été cultivés jusqu'au stade blastocyste dans du sérum sanguin homologue (WINTENBERGER, DAUZIER et THIBAUT, 1953). Dans un tel milieu, l'œuf de Vache, au contraire, ne se divise jamais (PINCUS, 1951 ; HAFEZ, SUGIE et GORDON, 1963).

Nous avons recherché un milieu permettant sa culture. Le liquide amniotique s'est révélé, même après chauffage à 58-60°C pendant 20 minutes, hautement toxique. L'analyse cytologique montre que la mort de l'œuf intervient en quelques heures.

Le liquide de Locke, le mélange de Locke et de sérum, l'humeur aqueuse, ne permettent également aucune segmentation.

Avec le sérum homologue, chauffé à 56°C pendant 20 à 30 minutes, nous n'avons que rarement observé des divisions régulières.

Au contraire, le liquide des follicules de de Graaf s'est révélé comme un bon milieu de culture permettant d'obtenir des clivages réguliers allant jusqu'à 24 blastomères ; l'intégrité des structures cytoplasmiques et nucléaires et la présence de figures mitotiques confirment sa valeur.

TABLEAU I

Vache n°	Durée de culture (en heures)	Age de l'œuf à la mise en culture (en heures)	Stade de l'œuf à la mise en culture	Stade de l'œuf à la fin de la culture	Stade de l'œuf après 2½ heures	Stade de l'œuf après 4½ heures	Décali abattage-culture (minutes)	Conclusions	
1° 22 à 24 heures	22	36	4	8			8	normal	
	23	24,5	1	2			8,5	retard	
	24	35	2	8			7	normal	
	24	26,5	4	12			8	normal	
	24	36	4	8			10	normal	
2° 25 à 31 heures	25	27	2	8			9,5	normal	
	25	36	4	8			10,5	retard	
	26	26	1	2			10	normal	
	27,5	27	2	2	2			9	arrêt
	27,5	36	4	4	8	8	8	8	normal
	27,5	36	4	4	8	8	8	8	normal
	31	26	2	2	8	8	8	7	normal

TABLEAU I (suite)

Vache n°	Durée de culture en (heures)	Age de l'œuf à la mise en culture (en heures)	Stade de l'œuf à la mise en culture	Stade de l'œuf à la fin de la culture	Stade de l'œuf après 24 heures	Stade de l'œuf après 48 heures	Délai abattage-culture (minutes)	Conclusions	
3 ^o 44 à 54 heures	49,5	36	4	8	8		8,5	arrêt	
	44	26,5	4	2	2		8	arrêt (retard)	
	44	27	2	4	4		8	arrêt	
	47	36	6	6	6		8	arrêt	
	48	37,5	4	8	6		7,5	retard	
	48	26	6	10	10		7,5	retard	
	49	21	1	10	10	30 h = 8	8	normal	
	50	35	4-6	16	8		7,25	normal	
	51	27,5	4-6	16	8		7,25	normal	
	53	36,5	4-6	4	4		7,25	normal	
				1	4		8	arrêt	
				4	10		9,5	arrêt	
				6	24		9,5	normal	
4 ^o Au-delà de 54 heures	57	36	8	16	10-12		6,7	presque normal	
	58	36	2	14-16	8		6,5	presque normal	
	65,5	24,5	4	16	12		9	arrêt	
	70	24,5	1	8	12	20 h = 4	6	probable	
	72	41	4	10	6-8		6	arrêt	
	77	36	8	16-24	12	16	12	retard ou arrêt	
	83	25,5	6	16-24	8		12	retard ou arrêt	
	95	27	4	8	4		10,5	arrêt	
	95,5	36	2	4	8		8	arrêt	
	119	27	2	14	6		12	dégénéré	
								10,5	arrêt

Le liquide folliculaire est prélevé aseptiquement sur des ovaires de Vaches ayant reçu, 60 heures avant, une injection intraveineuse de 7 500 UI de PMS.

Les œufs ont été recueillis, le plus souvent, de la façon suivante : l'animal aussitôt saigné est suspendu par le train postérieur et éviscéré, les trompes sont perfusées *in situ* de la corne utérine vers le pavillon avec du sérum homologue à 37°C ; le liquide de perfusion coulant du pavillon est collecté dans un verre de montre ; les œufs sont recherchés et transportés immédiatement dans du liquide folliculaire. C'est le délai entre la mort de l'animal et le transfert des œufs dans le liquide folliculaire qui figure dans la colonne 8 du tableau.

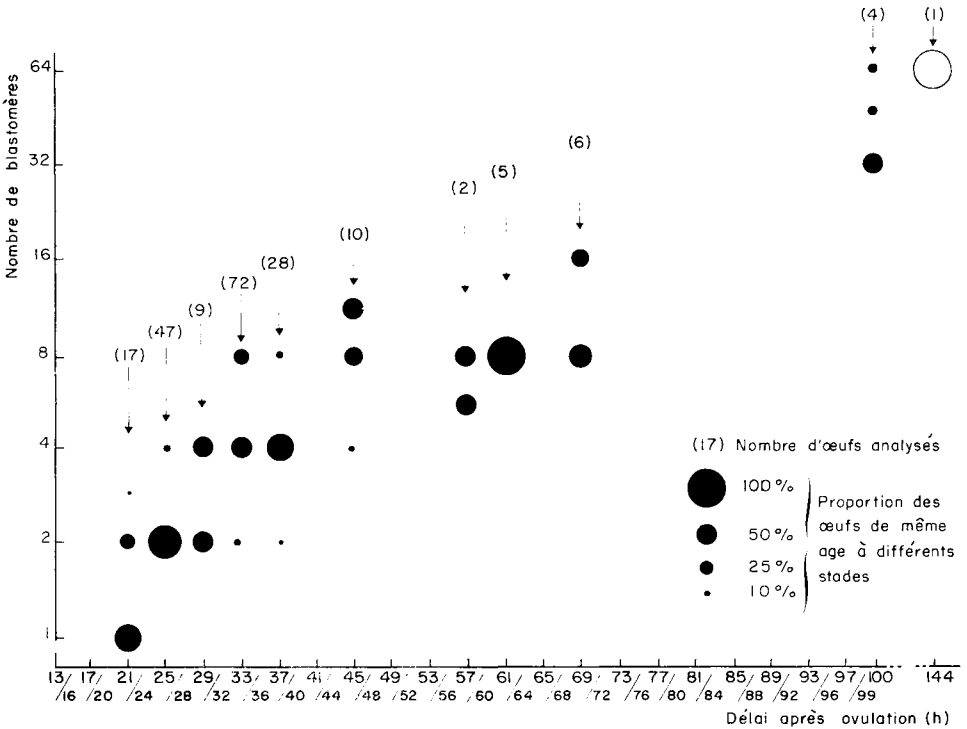


FIG 1

La culture est effectuée dans des tubes de verre fermés aux deux extrémités par une goutte d'huile de paraffine et placés sur un rotor, tournant de façon discontinue (voir THIBAUT et DAUZIER, 1961).

Tous les œufs ont été fixés, inclus, coupés à 10 µ, colorés et analysés par examen microscopique au 40 × ou au 100 × Planapochromat de Zeiss.

Pour reconnaître si la vitesse de segmentation était la même *in vitro* qu'*in vivo*, nous avons reporté sur un graphique les stades de segmentation observés à des délais croissants après l'ovulation (fig. 1) de Vaches normales, accouplées ; les valeurs obtenues sont conformes à celles publiées par AMOROSO, GRIFFITHS et HAMILTON, (1942).

Le tableau 1 groupe les résultats que nous avons obtenus avec des œufs mis en culture 12 minutes ou moins après la mise à mort de l'animal.

Ces résultats sont classés par durées de culture croissantes.

Tout d'abord, on doit remarquer que parmi les œufs non divisés au moment, de la mise en culture, 3 sur 10 n'ont pas dépassé le stade 2 cellules (S 482, E 850 E 632). Il est possible que ces œufs aient déjà subi un retard dans leur développement avant la mise en culture (fécondation tardive, par exemple) ou que le stade 2-4 soit difficile à franchir *in vitro*.

Lorsque la durée de la culture est de 22 à 24 heures, la segmentation se poursuit d'une manière parfaitement normale, à l'exception d'un œuf (S 482) rentrant dans la catégorie ci-dessus.

Il en est de même si la durée de culture est comprise entre 27 et 31 heures. Un seul retard a été observé, il intéresse également un œuf non divisé au moment de la mise en culture (E 850).

Pour des cultures de 44 à 54 heures, les arrêts sont fréquents au stade 8-10, et seulement 5 œufs sur 15 ont continué à se diviser normalement (S 287, S 357, S 210 et S 319).

Au-delà de 54 heures, tous les œufs ont subi un arrêt plus ou moins précoce de leurs divisions et aucun n'a dépassé le stade 16-24 blastomères.

L'œuf de Vache se comporte donc plus comme un œuf de Brebis que comme un œuf de Souris, totalement incapable de franchir le stade 2 *in vitro* quel que soit le milieu, ou comme un œuf de Lapine, qui atteint *in vitro* le stade blastocyste sans difficulté.

Il nous apparaît donc nécessaire de procéder à des cultures d'œufs plus âgés à partir du stade 16 ou 24 blastomères pour voir si ces œufs sont capables alors, après avoir dépassé un stade critique comme les œufs de Brebis, de se segmenter *in vitro* jusqu'à un stade avancé.

En résumé, dans le liquide folliculaire homologue, l'œuf de Vache se divise régulièrement *in vitro*, au moins jusqu'au stade 8-12, le stade 24 cellules est parfois atteint, mais en l'état actuel de nos expériences, nous ne sommes pas parvenus à le dépasser.

Reçu pour publication en avril 1966.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée grâce à l'aide de la D. G. R. S. T. à qui nous exprimons nos remerciements. (contrat 63 FR099)

SUMMARY

IN VITRO CULTURE OF COW EGG

The liquid from the large graafian follicles of cow ovary induced by PMS injection, revealed a medium suitable for *in vitro* segmentation of fertilized cow egg. This segmentation could not be obtained in other media.

The egg regularly cleaved up to the 8-12 cells stage, sometimes to 16-24 cells stage, which *in vivo* is the stage when the egg shifts to the uterus.

The speed of cleavage is always the same as *in vivo* at least during 31 hours of culture. But from 44 hours onwards, some eggs only keep on cleaving at normal rate.

The 24-cell stage was never passed beyond, even after 119 hours of culture.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMOROSO E. C., GRIFFITHS W. F. B., HAMILTON W. J., 1942. The early development of the goat (*Capra hircus*). *J. Anat.*, **76**, 377-406.
- BRINSTER R. L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of Mouse ova from two cells to blastocyst. *Exp. Cell Res.*, **32**, 205-208.
- BRINSTER R. L., 1965. Studies on the culture of Mouse ova. A Ciba Symposium on « *Preimplantation stages of pregnancy* ».
- HAFEZ E. S. E., SUGIE T., GORDON I., 1963. Superovulation and related phenomena in the beef Cow. I. Superovulatory responses following PMS and HCG injections. *J. Reprod. Fertil.*, **5**, 359-379.
- HAMMOND J. jr, 1949. Recovery and culture of tubal Mouse ova. *Nature*, **163**, 28.
- MINTZ B., 1965. Nucleic acid and protein synthesis in the developing Mouse egg. A Ciba Symposium on « *Preimplantation stages of pregnancy* ».
- MULNARD J. G., 1965. Studies of regulation of Mouse ova *in vitro*. A Ciba Symposium on « *Preimplantation stages of pregnancy* ».
- PINCUS G., 1949. Observations on the development of Cow ova *in vivo* and *in vitro*. *Proc. 1st Nat. Egg Transfer. Breed. Conf., San Antonio, Texas*, 18-21.
- TARKOWSKI A. K., 1965. Embryonic and postnatal development of Mouse chimeras. A Ciba Symposium on « *Preimplantation stages of pregnancy* ».
- THIBAUT C., DAUZIER L., 1961. Analyse des conditions de la fécondation *in vitro* de l'œuf de la Lapine. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 277-294.
- WHITTEN W. K., 1956. Culture of tubal Mouse ova. *Nature*, **177**, 96.
- WINTENBERGER S., DAUZIER L., THIBAUT C., 1953. Le développement *in vitro* de l'œuf de la Brebis et de celui de la Chèvre. *C. R. Soc. Biol.*, **147**, 1971-1973.
-