

ÉTUDE DE LA RESPIRATION DES BLASTOCYSTES DE LAPINE EN CULTURE *IN VITRO*

Suzanne WINTENBERGER-TORRÈS

avec la collaboration technique de Nicole VERMEIRE

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

RÉSUMÉ

On a mesuré la consommation en oxygène de blastocystes de Lapine pour évaluer leur activité métabolique et en déduire leur potentiel de développement ultérieur.

Une adaptation de l'oxygraphe Gilson a permis de faire des mesures individuelles de blastocystes âgés de 5 jours.

Il existe une corrélation significative entre la taille des blastocystes, leur poids, leur nombre de cellules et la consommation d'oxygène. Cependant, pour des blastocystes de même taille, des variations non négligeables d'activité respiratoire sont enregistrées ; elles pourraient être l'expression d'aptitudes différentes à la survie.

INTRODUCTION

Avant que des signes cytologiques de dégénérescence ne deviennent visibles dans le blastocyste, on peut penser que se produit une réduction préalable de l'activité métabolique et de la respiration en particulier. Il est, en effet, logique d'admettre que les atteintes nucléaires et morphologiques observées sont la conséquence de modifications profondes du métabolisme cellulaire.

Désirant étudier cette relation probable entre l'activité respiratoire et la vitalité des blastocystes, nous avons entrepris l'étude de la consommation d'oxygène du blastocyste de Lapine.

FRIDHANDLER, HAFEZ et PINCUS (1957), FRIDHANDLER (1961) et plus récemment, BRINSTER (1968) ont montré qu'il y avait une oxydation aérobie du glucose par les blastocystes de Lapine âgés de 4, 5 et 6 jours. Les mesures avaient été faites sur un ou plusieurs blastocystes groupés en utilisant le « Cartésien diver » de Holter. Cet appareil est d'un maniement délicat et nous lui avons préféré l'oxygraphe Gilson.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les blastocystes sont recueillis par perfusion des cornes utérines de lapines *New Zealand* abattues 5 jours *1/2 post coitum*. Le même milieu est utilisé pour la perfusion et la culture. Sa composition est :

- 10 ml de F₁₀ ou 199 ;
- 1 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 7 ;
- 0,5 ml de sérum de lapine gestante (au 5^e jour) chauffé 30' à 56°C ;
- 0,5 ml de sérum de poulain ;
- 100 µg de pénicilline ;
- 50 µg de streptomycine.

Environ 12 heures à l'avance, le milieu est stabilisé à 37°C sous atmosphère air + 5 p. 100 de CO₂, à seule fin d'éviter, par un réchauffement brutal de + 4° à + 37°, au moment de la mesure, la condensation de gaz dissous sur les parois de la cuve de l'oxygraphe, ce qui fausserait les résultats.

La perfusion des cornes utérines est faite à 37°C et les blastocystes sont placés, soit dans des tubes fermés aux deux extrémités par de l'huile de paraffine, soit dans des salières dont le couvercle est luté à l'huile de paraffine.

L'oxygraphe Gilson mesure la diminution de concentration en O₂ d'un milieu par les variations d'intensité de courant électrique qu'elle provoque entre une électrode vibrante en Pt, plongeant dans le milieu à étudier et une électrode au calomel située à l'extérieur. Cette électrode au calomel plonge dans un réservoir de solution saturée de KCl relié à la cuve de culture. Le contact électrique est donc établi entre les 2 électrodes par un circuit de KCl et une migration constante de KCl à travers un verre fritté qui constitue le fond de la cuve dans laquelle plonge l'électrode vibrante (fig. 1). Nous verrons plus loin que l'apport supplémentaire de KCl dans la cuve de culture ne modifie pas la qualité de la survie.

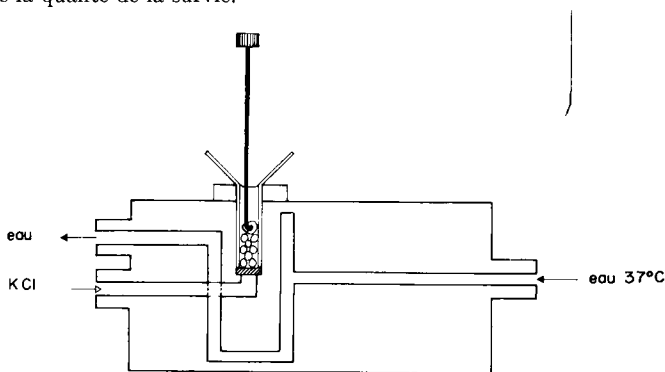


FIG. 1. — Schéma de la cuve de l'oxygraphe

L'ensemble est en plexiglas, tandis que le corps principal cylindrique comporte une chemise de pyrex. La figure en coupe comprend, au niveau de la partie centrale, et de bas en haut :

- le disque en verre fritté qui constitue le fond ;
- les étages de billes de verre ;
- l'extrémité inférieure de l'électrode de platine ;
- en arrière-plan de l'électrode est figuré : le blastocyste.

Pour que les variations d'intensité du courant électrique entre les deux électrodes soient assez élevées, l'électrode vibrante doit être distante d'au moins 1 centimètre du verre fritté.

On est donc conduit, pour pouvoir travailler dans 0,1 ml de milieu (volume maximum conditionnant la sensibilité désirée), à remplir le fond de la cuve avec 18 billes de verre de 2 mm de diamètre. Après avoir placé le milieu de culture, le blastocyste et l'électrode, on dépose à la surface 0,1 ml d'huile de paraffine. La couche d'huile retarde la réabsorption d'air dans le milieu au fur et à mesure que la concentration en O₂ diminue.

Les mesures rapportées représentent 10 minutes de consommation d'O₂.

Une comparaison valable des consommations d'oxygène ne peut être établie qu'entre blastocystes de taille très voisine, ou en tenant compte de leur taille. Mais, bien que tous les blastocystes d'une Lapine soient de même âge, ils présentent des différences de tailles assez importantes.

Nous avons donc, pour chaque blastocyste, mesuré sa taille, son poids et, pour certains, le nombre de cellules.

La forme des blastocystes n'étant pas toujours sphérique, la taille a été évaluée en calculant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires aux moments de la mise en culture et juste avant la mise en place dans l'oxygraphe. Nous n'avons pas mesuré la taille du bouton embryonnaire, car son contour est mal défini et irrégulier. Par contre, le poids sec des blastocystes a été déterminé immédiatement après la mesure de l'activité respiratoire : les blastocystes sont placés dans un panier métallique et arrosés de sérum physiologique, puis d'alcool méthylique bidistillé, et desséchés sous vide 30 mn à 30°C. L'alcool méthylique permet un excellent rinçage du blastocyste et, en le fixant, le rend moins fragile pour les manipulations suivantes.

En vue d'effectuer une numération de cellules, les blastocystes desséchés sont repris et traités à la pronase pour digérer la zone pellucide. Une coloration à l'acéto-orcéine et un écrasement entre lame et lamelle permettent d'obtenir un « squash » et de compter les noyaux à l'aide d'un microprojecteur.

RÉSULTATS

I. Mesure des blastocystes

On peut identifier un blastocyste au moyen de trois paramètres : la taille, le poids, le nombre de cellules. Or, la taille est mesurée, soit au moment de la mise en culture, soit une dizaine de minutes avant la mesure de la consommation d'O₂, tandis que le poids et le nombre de cellules reflètent exactement l'état du blastocyste juste après la mesure dans l'oxygraphe.

On trouve une corrélation hautement significative :

- de 0,82, entre la taille et le nombre de cellules (fig. 2) ;
- de 0,83, entre la taille et le poids (fig. 3) ;
- et de 0,79 entre le poids et le nombre de cellules (fig. 4).

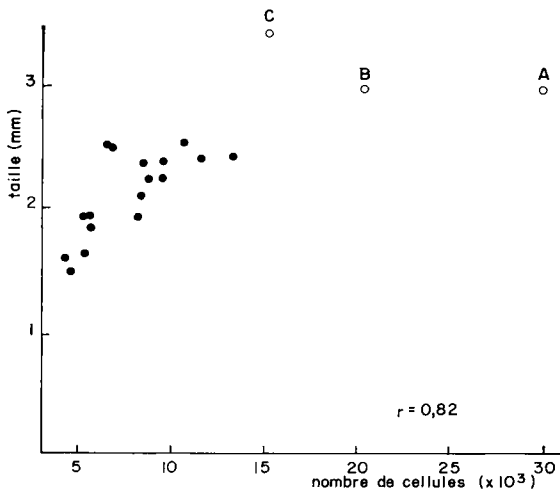


FIG. 2. — Représentation des blastocystes : taille en fonction du nombre de cellules

r = Coefficient de corrélation

La taille est représentée par la moyenne de deux diamètres perpendiculaires

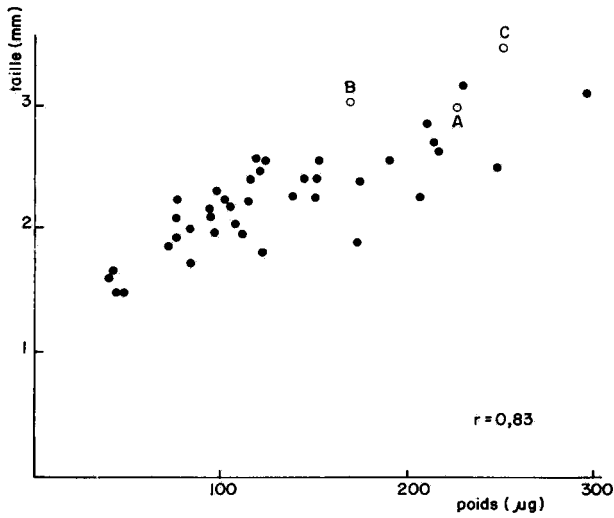


FIG. 3. — Représentation des blastocystes: taille en fonction du poids
 r = Coefficient de corrélation

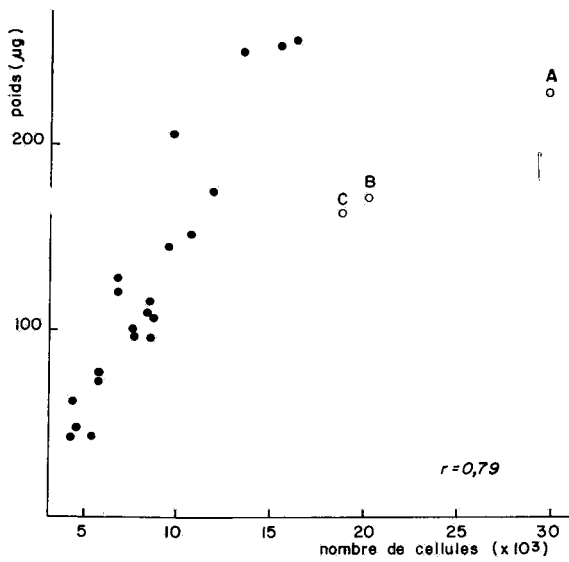


FIG. 4. — Représentation des blastocystes: poids en fonction du nombre de cellules
 r = Coefficient de corrélation

Les corrélations significatives entre la taille, le poids et le nombre de cellules, montrent que la consommation d'oxygène peut être rapportée indifféremment à l'une de ces valeurs.

On remarque que les blastocystes A, B et C s'écartent des autres données (fig. 2). Sur la figure 4, on retrouve aussi une position un peu à l'écart de ces trois valeurs. La situation de ces points, par rapport à l'abscisse, montre que le nombre de cellules a cru plus vite que la taille, ce qui s'expliquerait, peut-être, par le développement du bouton embryonnaire. On ne comprend pas alors pourquoi le poids n'augmente pas dans les mêmes proportions que le nombre de cellules (fig. 4). Il est possible qu'une perte de poids se produise au moment du lavage à l'alcool méthylique : nous avons constaté, en effet, que les plus gros blastocystes subissaient parfois une légère rétraction, avec départ du liquide du blastocoele. La réintégration des points A, B, C dans l'ensemble des données représentées sur la figure 3, paraît alors logique.

2. Mesures de la consommation d'oxygène

Les exigences expérimentales nous ont obligés à étudier la respiration des blastocystes après des temps de culture variés. Comme il n'est pas exclu que le séjour en culture puisse avoir une influence défavorable sur le métabolisme du blastocyste brusquement enlevé du milieu utérin, dans un premier examen des résultats, nous avons séparé les blastocystes étudiés dans l'heure suivant la perfusion de ceux ayant séjourné 2 heures ou plus en culture.

Un parallèle entre la taille et la consommation montre que les maxima correspondent de façon satisfaisante, aussi bien pour les blastocystes étudiés dans la première heure après la perfusion (fig. 5), que plus tard (fig. 6).

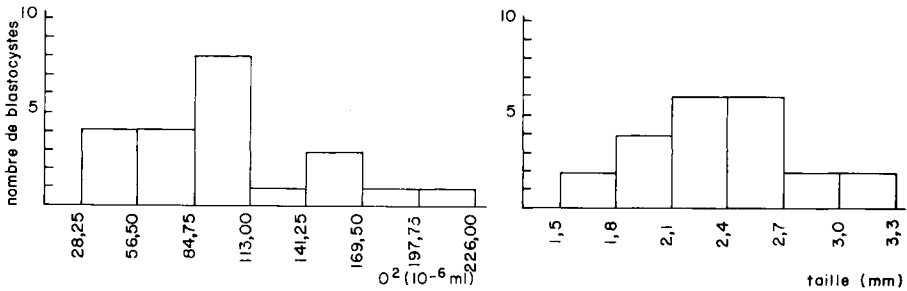


FIG. 5. — Les histogrammes représentent, pour des blastocystes étudiés immédiatement après récolte et jusqu'à 1 h 30 après culture :

- d'une part, le nombre de blastocystes ayant la même consommation d'oxygène ;
- d'autre part, le nombre de blastocystes présentant la même taille.

Dans les limites des temps de culture pratiqués ici, il existe donc une relation entre la consommation d'oxygène et la taille (fig. 7). Nous n'avons pas tenu compte, pour les calculs suivants, des différences dans les temps de culture.

Avec les 20 blastocystes, pour lesquels nous possédions les 4 caractéristiques, les corrélations et la régression progressive calculée sur ordinateur, ont donné les résultats suivants :

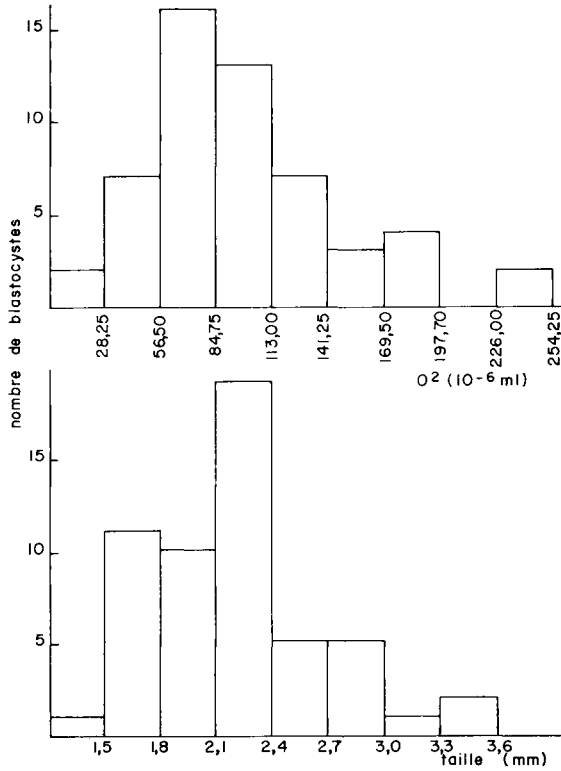


FIG. 6. — Les histogrammes ont été établis de la même façon que ceux de la figure 5, mais pour des blastocystes étudiés après 2 à 8 heures de culture

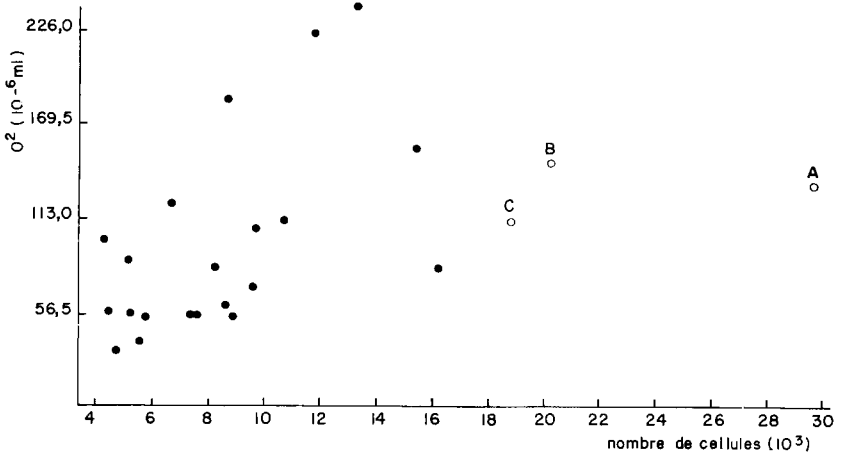


FIG. 7. — Valeurs des consommations en O_2 des blastocystes en fonction du nombre de cellules

— *Corrélations totales.*

Corrélation respiration/taille	0,52 ⁽¹⁾
Corrélation respiration/poids	0,66 ⁽²⁾
Corrélation respiration/nombre de cellules	0,47 ⁽¹⁾

On constate que la liaison respiration/poids est la plus forte, ce qui semble logique. On pèse, en effet, le blastocyste immédiatement après la mesure de la consommation d'oxygène, alors que la mesure de la taille est effectuée une dizaine de minutes avant la mise en place dans la cuve de l'oxygraphe.

— *Régression progressive.*

La régression entre la respiration et le poids est hautement significative et l'introduction de la taille améliore encore la relation avec la respiration, mais la prise en considération du nombre de cellules n'apporte aucune modification.

DISCUSSION

Par une méthode de mesure différente, nous arrivons à des résultats assez comparables à ceux de FRIDHANDLER, HAFEZ et PINCUS (1957). D'après ces auteurs, un blastocyste de Lapine, à 115 heures *post-coitum*, consomme 78 μl /heure d'oxygène.

Selon GULYAS et DANIEL (1967), un blastocyste à peu près de même âge (120 heures) a une consommation de $63,20 \pm 9,69 \mu\text{l}$ / heure. Nos résultats se situent, pour les plus petits blastocystes de 140 heures, aux environs de 339 μl /heure. Cette valeur, plus élevée, s'explique par la rapide croissance des blastocystes entre 4 et 5 jours.

La méthode d'étude individuelle employée ici paraît donc satisfaisante, cependant, elle ne peut être réalisée qu'avec des blastocystes ayant atteint une certaine taille. La figure 7 montre, en effet, qu'en dessous de 4 000 cellules, la sensibilité de l'appareil est insuffisante. L'oxygraphe Gilson ne permettrait donc pas d'étudier des blastocystes de 4 jours. Par ailleurs, en présence de très gros blastocystes, il faut augmenter le volume de milieu dans la cuve de l'oxygraphe : nous avons constaté en effet, que si le blastocyste est accolé à l'électrode, le tracé d'enregistrement reste parallèle à l'axe des abscisses.

L'apport supplémentaire de KCl, dans le milieu de culture, durant l'observation dans l'oxygraphe, ne paraît pas nocif pour les blastocystes dont la plupart continuent à grossir pendant leur séjour.

Nos résultats laissent apparaître une corrélation entre la respiration et la taille des blastocystes. Mais pour des blastocystes sensiblement de même taille, il existe des variations non négligeables des consommations d'oxygène. Ces différences ne sont cependant pas suffisantes pour mettre en cause la corrélation statistique globale. La transpiration de blastocystes de même taille, mais présentant des différences d'activité respiratoire, pourrait seule nous indiquer si la mesure de la consommation d'oxygène du blastocyste peut être considérée comme critère de viabilité.

Reçu pour publication en décembre 1969.

(1) Liaison significative.

(2) Liaison hautement significative.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés partiellement grâce aux subventions du C. N. R. S. (R. C. P. 36). Nous remercions M^{lle} Aline SOLARI, pour l'interprétation statistique des résultats qu'elle a effectuée et M. TOMASSONE, pour les calculs faits sur ordinateur.

La mise au point de la technique a pu être menée à bien grâce à la collaboration des Établissements GILSON (France).

SUMMARY

INVESTIGATION ON RESPIRATION OF *IN VITRO* CULTURED RABBIT BLASTOCYSTS

Oxygen consumption measurements of Rabbit blastocysts were designed to test their metabolic activity and their further developmental abilities.

The measurements were made using a Gilson oxygraph with a bulb so modified as to increase sensitivity for the study of one blastocyst only.

The size, weight and cell numbers of the blastocysts were estimated in order to allow an accurate comparison of their respiratory activities. There was a highly significant correlation between size and cell number ($r = 0.82$, figure 2), between size and weight ($r = 0.83$, figure 3), between weight and cell number ($r = 0.79$, fig. 4). The comparison between oxygen consumptions can therefore be related to any of the three parameters.

Total correlation between respiration and weight was the most significant, which was substantiated by the calculation of progressive regression.

Oxygen consumption values estimated over a 10 mn period ranged from 34×10^{-6} ml for a 4,800 cell blastocyst to 242×10^{-6} ml for a 13,400 cell one. For blastocysts of similar sizes, the variations observed in respiratory activity were considerable, though not altering the statistical correlation.

Further experiments on transplantation are required to determine whether oxygen consumption is a suitable criterion for developmental ability.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BRINSTER R., 1968. Carbon dioxide production from glucose by the pre-implantation rabbit embryo. *Exp. Cell Res.*, **51**, 330-334.
- FRIDHANDLER L., 1961. Pathways of glucose metabolism in fertilized rabbit ova at various pre-implantation stages. *Exp. Cell Res.*, **22**, 303-316.
- FRIDHANDLER L., HAFEZ E. S. E., PINCUS G., 1957. Developmental changes in the respiratory activity of rabbit ova. *Exp. Cell Res.*, **13**, 131-139.
- GULYAS B. J., DANIEL J. C. JR, 1967. Oxygen consumption in diapausing blastocysts. *J. Cell Physiol.*, **70**, 33-36.
- HOLTER H., 1943. Technique of the Cartesian diver. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, **24**, 400-460.