

LA CULTURE *IN VITRO* DE L'ŒUF DE VACHE (1)

C. THIBAUT

avec la collaboration technique d'Anne-Marie MELIÈRES, Anne-Marie ESCAFFRE
et Yves de FONTAUBERT

Institut national de la Recherche agronomique
Station centrale de Physiologie animale, 78 - Jouy-en-Josas, France

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 (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 Chèvre 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 blas-

(1) Article paru *in extenso* dans *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1966, **6**, 158-164.

tomères ; l'intégrité des structures cytoplasmiques et nucléaires et la présence de figures mitotiques confirment sa valeur.

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

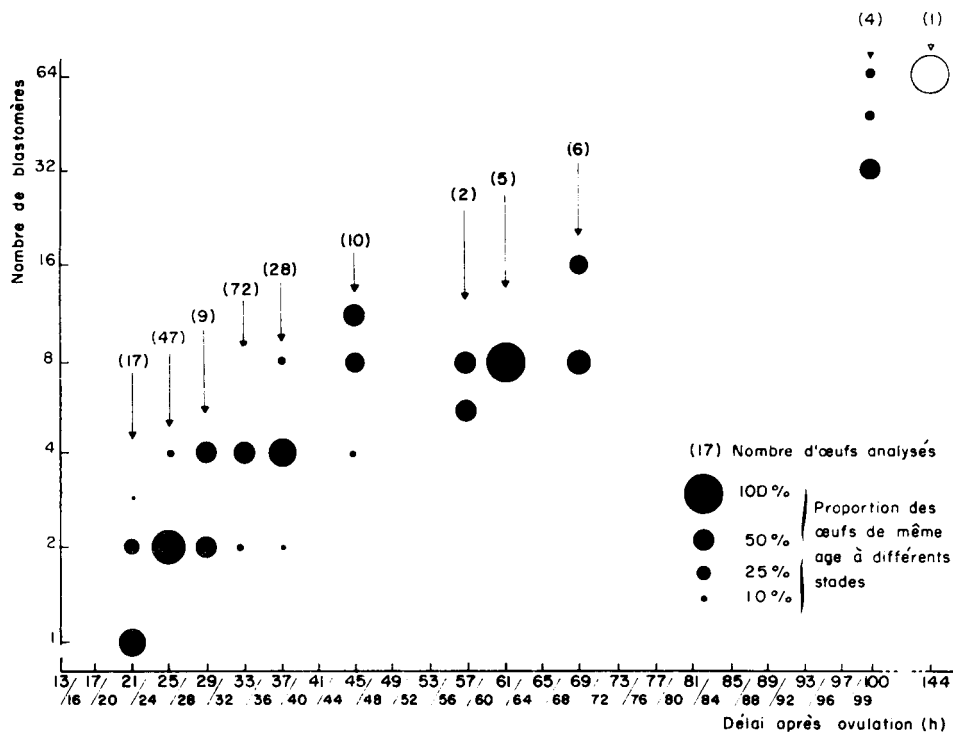


FIG. 1.

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 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 X ou au 100 X 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 Lapine, qui atteint *in vitro* le début du 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.

RÉSUMÉ

Le liquide des follicules de Graaf, prélevé aseptiquement sur des ovaires de vaches stimulés par une injection de PMSG, s'est révélé comme un milieu convenable pour la segmentation *in vitro* des œufs de vaches. Cette segmentation n'a pas pu être obtenue dans d'autres milieux.

L'œuf s'est régulièrement divisé jusqu'au stade 8-12 cellules, quelquefois jusqu'au stade 16-24 cellules, ce qui correspond *in vivo* au stade où les œufs passent dans l'utérus.

La vitesse de segmentation est la même que celle observée *in vivo*, au moins pendant 31 heures de culture. Mais au-delà de 44 heures, quelques œufs seulement conservent le rythme normal de segmentation.

Le stade 24 cellules n'a jamais pu être dépassé, même après 119 heures de culture.

SUMMARY

IN VITRO CULTURE OF THE COW EGG

Graafian follicle liquid samples were aseptically taken from cow ovaries following stimulation by PMSG. This liquid proved to be a suitable medium for the *in vitro* segmentation of cow eggs which could not be obtained in other media.

TABLEAU I

Vache n°	Durée de culture en h	Age de l'œuf à la mise en culture en h	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
	1. 22 à 24 heures							
S 669	22	36	4	8			8	normal
S 682	23	24,5	1	2			8,5	retard
S 174	24	35	2	8			7	normal
S 171	24	26,5	4	12			8	normal
E 698	24	36	4	8			10	normal
	2. 25 à 31 heures							
E 625	25	27	2	8			9,5	normal
S 471	25	36	4	8			10,5	normal
E 850	26	26	1	2			10	retard
S 113	27,5	27	2	8			9	normal
			2	2			9	arrêt
S 236	27,5	36	4	8				normal
			4	8				normal
S 267	27,5	36	4	8				normal
S 272	29	36	4	8				normal
			4	8				normal
S 312	31	26	2	8			8	normal
			2	8			7	normal
			1	4			7	normal
	3. 44 à 54 heures							
S 424	49,5	36	4	8	8		8,5	arrêt
E 632	44	26,5	1	2	2			arrêt (retard)
E 851	44	27	2	4	4		8	arrêt

TABLEAU I (suite)

Vache n°	Durée de culture en h	Age de l'œuf à la mise en culture en h	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. 44 à 54 heures								
S 239	47	36	{ 6	6			8	arrêt
			{ 6	10				arrêt
S 193	48	37,5	{ 4	8	6		7,5	retard
S 287	48	26	{ 6	10	8		7,5	retard
S 357	49	21	{ 1	10	30 h = 8		8	normal
			{ 1	8			8	normal
S 210	50	35	{ 4-6	16	8		7,25	normal
			{ 4-6	16	8		7,25	normal
S 374	51	27,5	{ 1	4	8		7,25	normal
			{ 4-6	8	8		7,25	arrêt
S 319	53	36,5	{ 4	10	4		8	arrêt
			{ 6	24	8		9,5	arrêt
					8		9,5	normal
4. Au-delà de 54 heures								
S 310	57	36	{ 8	16	10-12		6,7	presque normal
			{ 2	14-16	8			presque normal
S 385	58	36	{ 2	16	12		6,5	arrêt
			{ 4	16	12			probable
S 332	65,5	24,5	{ 1	8	20 h = 4		9	arrêt
S 387	70	24,5	{ 1	10	6-8	6-8	6	retard ou arrêt
S 389	72	41	{ 8	16-24	12	16	6	retard ou arrêt
			{ 6	16-24	8		12	retard ou arrêt
S 196	77	36	{ 4	8	4		10,5	arrêt
B 658	83	25,5	{ 1	8	8		8	arrêt
E 587	95	27	{ 2	4			8	arrêt
S 288	95,5	36	{ 2	8			8-9	dégénéré
E 587	119	27	{ 2	14	6		10,5	arrêt

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

During the first 31 hours of culture, the cleavage rate was the same as that observed *in vivo*. However, after 44 hours, only some eggs maintained a normal cleavage rate.

Even after 119 hours of culture, the eggs never passed the 24-cell stage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMOROSO E. C., GRIFFITHS W. F. B., HAMILTON W. J., 1942. The early development of the goat (*Capra hircus*). *J. Anatomy*, **76**, 377-406.
- BRINSTER R. L., 1963. A method for *in vitro* cultivation of Mouse ova from two cell to blastocyst. *Exper. 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. Fert.*, **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*. *Proceed. 1rst 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.
-