

## RELATION ENTRE LA TAILLE DES BLASTOCYSTES DE LAPINE A L'IMPLANTATION ET LA SURVIE EMBRYONNAIRE

Suzanne WINTENBERGER-TORRES

avec la collaboration technique de Nicole VERMEIRE

Station centrale de Physiologie animale,  
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,  
78350 Jouy en Josas

---

### RÉSUMÉ

L'hétérogénéité de développement observée parmi les blastocystes de Lapines au 7<sup>e</sup> jour de la gestation pose le problème de la viabilité des plus petits.

On a étudié la relation entre la taille des blastocystes dans la corne utérine à 160 heures *post coitum*, la précocité de leur implantation et leur évolution en embryons normaux au 15<sup>e</sup> jour de la gestation.

La taille des blastocystes *in utero* a été mesurée grâce à un système de transillumination de l'utérus, et l'approche de l'implantation par la technique d'infiltration du bleu de Pontamine.

Le diamètre moyen des blastocystes visibles à travers l'utérus varie entre 2,5 et 9,5 mm. En-dessous de 2,5 mm, ils ne peuvent évoluer en embryons normaux à 15 jours. La taille n'est pas le seul facteur impliqué dans la survie embryonnaire. Pour une mortalité totale de 15 p. 100, la position des blastocystes en haut ou en bas des cornes entre pour 6 p. 100, leur accollement pour 3,2 p. 100. Dans les 5,8 p. 100 de mortalité restante, l'influence de la taille des blastocystes n'entretrait que pour la moitié.

La précocité de l'implantation agirait directement sur la mortalité embryonnaire. Lorsque les chambres d'implantations sont formées à 160 heures *post coitum*, la mortalité est de 11 p. 100, et 67 p. 100 des Lapines ont un fœtus dégénéré, alors que l'absence de différenciation de ces chambres à 160 heures correspond à une mortalité embryonnaire de 23 p. 100 et 100 p. 100 des Lapines ont un fœtus dégénéré.

La formation des chambres d'implantation, la position des blastocystes relèvent du conditionnement de l'utérus, tandis que le rôle de la taille, de l'accolement sont directement en relation avec le blastocyste.

---

Les blastocystes de Lapine présentent, au cours de leur vie libre dans l'utérus, une croissance très variable. ADAMS, HAY et LUTWAK-MANN (1961) trouvent au 5<sup>e</sup> jour *post coitum* que le diamètre moyen est compris entre 1,3 et 2,2 mm et BOMSEL-

HELMREICH (1965), au 6<sup>e</sup> jour, entre 1,8 et 6,5 mm. En supposant que le blastocyste soit une sphère, sa surface peut donc varier dans la proportion de 1 à 5, indiquant une différence importante de la vitesse de segmentation des cellules trophoblastiques.

Dans cette espèce, l'implantation différée étant impossible, une synchronisation étroite entre l'état qualitatif de l'endomètre et celui du trophoblaste est obligatoire. Du pouvoir invasif du trophoblaste dépend la fixation de l'œuf. Aussi avons-nous cherché à savoir si les blastocystes les moins développés ont les mêmes aptitudes que les autres à s'implanter et à évoluer ultérieurement.

La succession des événements qui conduisent à l'implantation est bien connue chez le Rat et la Souris, mais l'est avec moins de précisions chez le Lapin.

LUTWAK-MANN (1971) a déterminé très exactement le moment de l'implantation à 168 heures *post coitum*, d'après l'ajustement de la composition du liquide du blastocœle sur celui du sérum sanguin. A ce stade, le blastocyste occupe la lumière de l'utérus et provoque une distension de la paroi utérine qui le rend très visible.

Nous avons essayé de déterminer le moment de l'implantation de blastocystes de tailles diverses, et vérifié leur évolution après abattage des Lapines aux 15<sup>e</sup> ou 28<sup>e</sup> jour de la gestation.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Le travail comporte deux aspects :

### 1. — *Utilisation du bleu de Pontamine pour déterminer le début de la réaction déciduale et le moment de l'implantation*

La technique mise au point avec succès chez la Ratte par PSYCHOYOS (1960) a été appliquée chez la Lapine.

Des Lapines gestantes ont reçu 160, 184 ou 208 heures *post coitum* une injection intraveineuse de solution saline de bleu de Pontamine à 1 p. 100, à raison de 0,3-0,5 ml/100 g de poids corporel. L'animal est immédiatement anesthésié afin de suivre, après laparotomie, la progression de l'infiltration du colorant aux niveaux des lieux d'implantation. D'autres Lapines, après avoir subi l'injection, sont abattues 2 heures après, et l'utérus est éclairci selon la technique d'ORSINI (1962).

### 2. — *Corrélation entre la taille estimée des blastocystes, la réaction utérine et le développement embryonnaire*

Il est possible de mesurer la taille *in vivo* des blastocystes, pourvu qu'on place un éclairage sous la corne utérine qui permet de voir par transparence les contours. La source éclairante est constituée par une armature de plexiglas dans laquelle sont introduites 11 microampoules ou lucioles (fig. 1).

Les Lapines gestantes sont anesthésiées à 160 heures *post coitum*, la cavité abdominale est ouverte, l'utérus est dégagé ; on glisse sous chaque corne utérine le système d'éclairage. A l'aide d'une loupe binoculaire munie d'un micromètre oculaire, on mesure la zone claire qui correspond au blastocyste situé à l'intérieur de la corne utérine.

L'approche de l'implantation est appréciée d'après la formation de la hernie de l'utérus au niveau du blastocyste (fig. 2). On distingue trois stades :

a) Le blastocyste est nettement visible à l'intérieur de l'utérus et ne provoque qu'une faible distension, la paroi reste épaisse : c'est le stade I. On mesure le disque clair en prenant deux diamètres perpendiculaires orientés selon :

- l'axe mésométrial/antimésométrial,
- l'axe de la corne utérine.

La moyenne de ces deux diamètres représente la taille du blastocyste tel qu'il nous apparaît

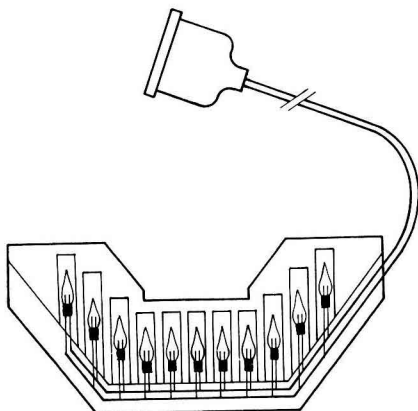


FIG. 1. — Système d'éclairage.

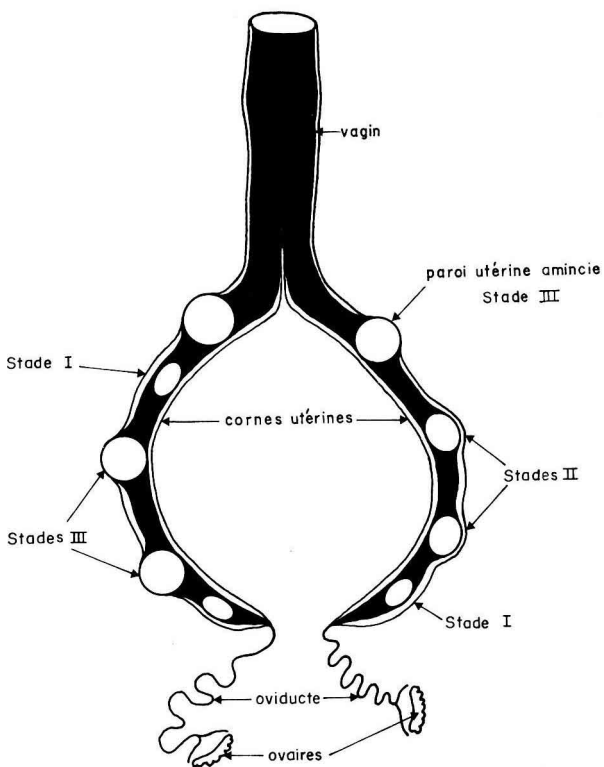


FIG. 2. — Schéma de la position des blastocystes à l'intérieur de la corne utérine

à travers la corne utérine. La mesure des deux diamètres est nécessaire, car il arrive, surtout chez les nullipares, que la corne utérine ait un diamètre inférieur au blastocyste qui s'y trouve comprimé et prend une forme allongée.

b) Le blastocyste commence à distendre la paroi utérine et forme du côté antimésométrial une bosse. C'est le stade II qui marque le début de la réaction de l'utérus par perte de son tonus (BOVING, 1954).

c) Le blastocyste distend la paroi utérine qui devient très amincie du côté antimésométrial : stade III. Cette hernie forme une véritable chambre d'implantation, telle que BOVING (1954) l'a décrite. La récupération des blastocystes à ce stade permet de voir l'empreinte d'une calotte qui correspond au dôme que forme l'utérus et dans laquelle les blastocystes sont en quelque sorte moulés.

Le tracé rectiligne des capillaires sanguins caractérise ce stade. L'implantation est proche. On mesure toujours aussi exactement que possible le disque clair et non le contour extérieur de la hernie.

La durée totale d'exposition de l'utérus ne dépasse pas 10 minutes. Pour vérifier l'exactitude des estimations, 7 Lapines ont été abattues immédiatement après et les blastocystes ont été récupérés un à un et mesurés. Les autres Lapines ont été abattues au 15<sup>e</sup> ou au 28<sup>e</sup> jour de gestation.

## RÉSULTATS

### 1. — Localisation de l'implantation à l'aide du bleu de Pontamine

a) Sur des Lapines opérées à 160 heures *p. c.*, les injections de bleu n'ont montré aucune infiltration du colorant du côté antimésométrial de l'endomètre aux niveaux des hernies qui sont toujours restées claires, quel que soit l'intervalle de temps entre l'injection et l'observation ou l'abattage de la Lapine (30 mn à 2 h).

b) Le test s'est également révélé négatif chez deux Lapines opérées à 184 heures et deux autres opérées à 208 heures *p. c.* Ajoutons que chez 7 Lapines injectées à 160 heures et abattues au 15<sup>e</sup> jour de la gestation et chez 5 autres ayant subi le même traitement et abattues à 28 jours, aucune action abortive du colorant n'a été enregistrée.

### 2. — Vérification des mesures des blastocystes *in vivo/in vitro*

Un contrôle s'avérait nécessaire pour évaluer l'erreur possible entre les deux séries d'observations.

L'erreur maximum enregistré *in vivo* pour des blastocystes de même taille *in vitro* (4,4 mm) a été dans un cas de 45 p. 100 du diamètre moyen (fig. 3). L'épaisseur de la paroi utérine au stade I est sans doute une source d'erreur, c'est pourquoi nous avons distingué les mesures faites au stade I de celles des stades II et III.

Le tableau 1 indique le diamètre moyen des blastocystes mesurés *in vivo* et *in vitro* pour les stades I et II-III.

Les tailles moyennes des blastocystes mesurés *in vivo* ne sont pas significativement différentes de celles des blastocystes récupérés *in vitro*, que l'utérus réagisse ou non.

On a représenté sur un graphique (fig. 4) les tailles moyennes des blastocystes *in vivo* pour chaque classe de taille de blastocystes récupérés *in vitro*. La courbe établie pour les stades II et III montre une meilleure correspondance que pour le stade I, la corrélation portant sur 40 données est de 0,835. Il est vraisemblable que l'amincissement de la paroi utérine aux stades II et III donne un contour plus net et permet une mesure plus exacte qu'au stade I.

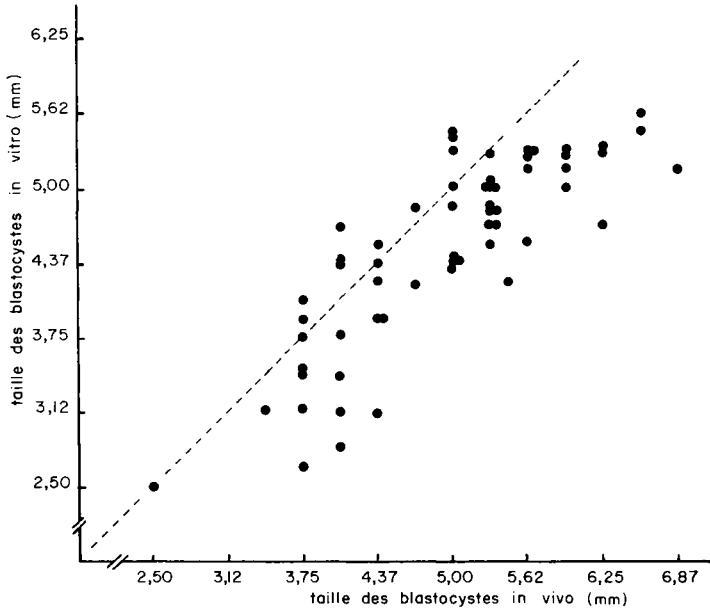


FIG. 3. — Correspondance entre la taille des blastocystes mesurés à travers l'utérus (in vivo) et leur taille réelle (in vitro). Les résultats sont classés par groupes de taille (in vivo.)

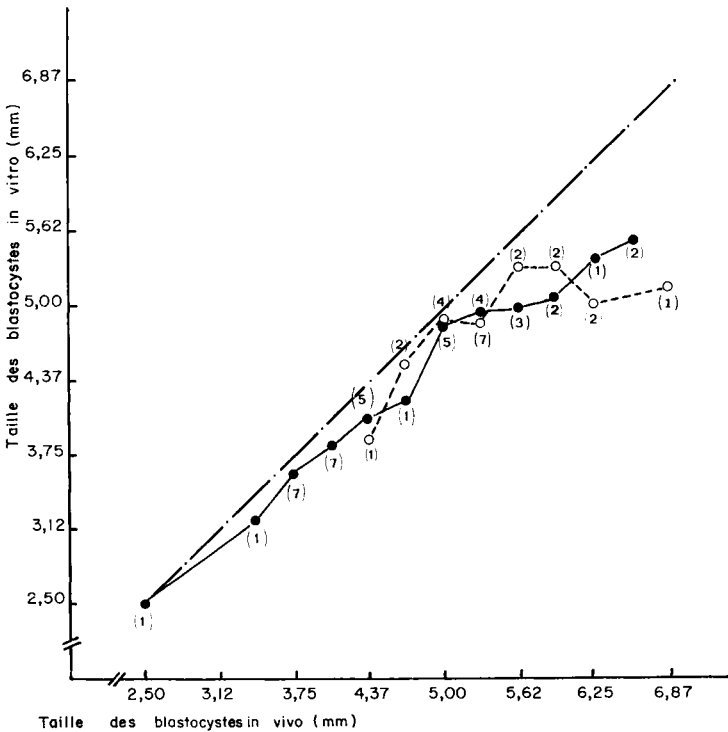


FIG. 4. — Correspondance entre la taille des blastocystes mesurés à travers l'utérus (in vivo) et leur taille réelle (in vitro)

- Stade I, pas de réaction de l'utérus ;
- Stades II et III, hernies formées

TABLEAU I

*Taille moyenne (mm) des blastocystes mesurés in vivo et in vitro dans les cas où les hernies ne sont pas formées (stade I) ou sont formées (stades II et III)*

	Stade I		Stades II et III	
Taille des blastocystes <i>in vivo</i> (mm)	4,72	S	5,40	
	NS ↓	→ NS	↓ NS	
Taille des blastocystes <i>in vitro</i> (mm)	4,30	S	4,90	
		→		

### 3. — Relation entre la taille des blastocystes, la précocité de l'implantation et la survie

Les injections de bleu de Pontamine n'ayant donné lieu à aucune diffusion du colorant au niveau des blastocystes, nous avons évalué l'approche de l'implantation d'après le passage des stades I à II et III, autrement dit d'après la formation des hernies de l'utérus.

L'examen *in vivo* de l'utérus n'entraîne aucune action abortive pourvu que l'extériorisation ne dure pas plus de 10 minutes.

À partir des examens de 30 Lapines abattues au 15<sup>e</sup> jour de la gestation et de 8 autres abattues au 28<sup>e</sup> jour, la comparaison a porté sur 347 blastocystes mesurés à 160 heures.

Chez les 8 Lapines abattues au 28<sup>e</sup> jour de la gestation, 3 fœtus ont dégénéré aux environs du 15<sup>e</sup> jour et 3 autres pendant la deuxième moitié de la gestation. Les dégénérescences attribuées à la première moitié de la gestation ont été regroupées avec les résultats des Lapines abattues à 15 jours.

Il a été jugé préférable, pour la suite de ces expériences, d'abattre au 15<sup>e</sup> jour car il est vraisemblable que la mortalité après ce stade est due à des problèmes de développement placentaire et utérin, plutôt qu'à la taille des blastocystes avant l'implantation.

La formation des hernies correspond généralement à une augmentation de la taille des blastocystes (fig. 5). Mais, bien que nos observations aient toujours été faites à 160 heures, on constate que la réaction de l'utérus n'est pas toujours aussi avancée d'un animal à l'autre et il est possible que de gros blastocystes soient dans un utérus au stade I, comme le montre la première partie du graphique (fig. 5).

De même, l'abattage de Lapines à des temps variés après 160 heures a permis de constater que l'attache des cellules trophoblastiques à la paroi utérine peut différer de 8 heures, ce qui est en accord avec les temps de 162 heures et 168 heures donnés respectivement par HAFEZ et RAJAKOSKI (1964) et LUTWAK-MANN (1971).

Quand l'utérus n'a pas commencé à réagir (stade I) à 160 heures, la mortalité embryonnaire à 15 jours est de 23 p. 100 et 100 p. 100 des Lapines ont au moins un fœtus dégénéré. Chez deux Lapines ayant des blastocystes visibles par transparence,

mais dont l'utérus ne présentait aucune hernie à 160 heures, on n'a retrouvé aucun fœtus vivant à 15 jours. Quand on observe des stades II et III à 160 heures, la mortalité est de 11 p. 100 et 67 p. 100 des Lapines ont une dégénérescence.

Ces résultats montrent qu'il existe une relation entre le retard d'implantation et la mortalité embryonnaire.

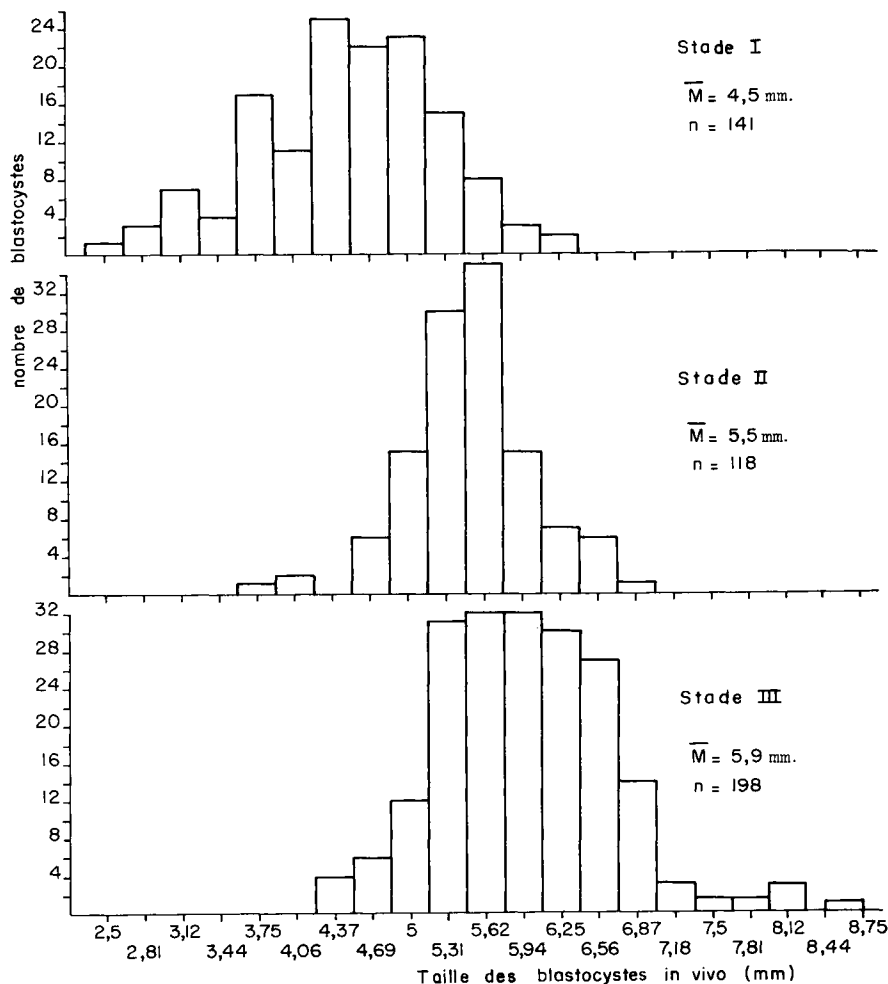


FIG. 5. — Histogramme des tailles des blastocystes mesurés in vivo en fonction de la formation des hernies de l'utérus.

La dégénérescence des fœtus en fonction de la taille des blastocystes a été représentée sur la figure 6. Les pourcentages sont calculés par rapport au nombre total de blastocystes vus à 160 heures auquel on ajoute les traces d'implantations dégénérées ou non qui correspondaient à des blastocystes non vus à l'opération.

52 blastocystes sur 347 (15 p. 100) ont dégénéré après implantation, dont 6 n'ont pas été vus à l'observation.

Si on considère les causes présumées de mortalité due à la situation dans les cornes, on peut distinguer trois catégories :

- 20 blastocystes sur 347 (6 p. 100) auraient dégénéré parce que situés en haut ou en bas des cornes ;
- 11 sur 347 (3,2 p. 100) parce qu'ils sont accolés ;
- le reste, 21 sur 347 (5,8 p. 100) dégénèrent soit parce qu'ils étaient trop petits (5) (taille moyenne < 3 mm), soit pour des raisons autres non connues.

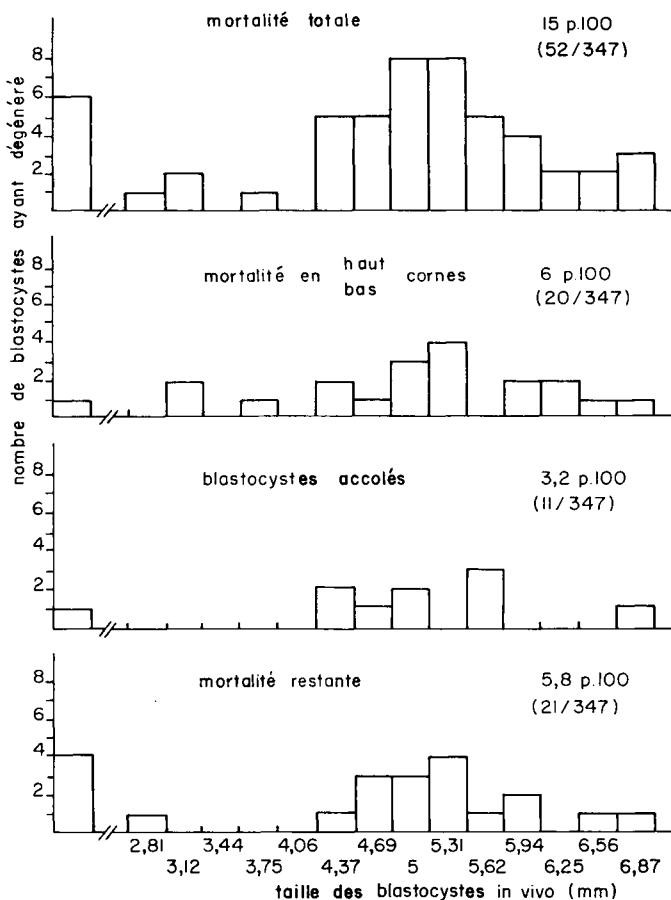


FIG. 6. — Histogramme des tailles des blastocystes ayant dégénéré

La courbe de fréquence des tailles des blastocystes mesurés *in vivo* et ayant évolué en embryons normaux à 15 jours (fig. 7) montre qu'on ne peut se prononcer sur l'influence de la taille sur l'évolution ultérieure que lorsque les blastocystes sont inférieurs à 2,5 mm.

Quant aux autres causes évoquées de mortalité embryonnaire : situation dans la corne, accollement, nous allons voir qu'on peut également les ramener soit à des retards d'implantation, soit à la taille des blastocystes.



La formation des hernies de l'utérus progresse depuis la partie cervicale des cornes vers le sommet. La mortalité des blastocystes situés tout à fait au sommet peut donc être attribuée à un retard d'implantation puisque le blastocyste considéré est au stade I, alors que les autres sont déjà aux stades II et III. C'est le cas de 4 d'entre eux. La position dans la région cervicale ne semble être néfaste que lorsque les blastocystes sont descendus dans la zone où les deux cornes sont accolées. Deux

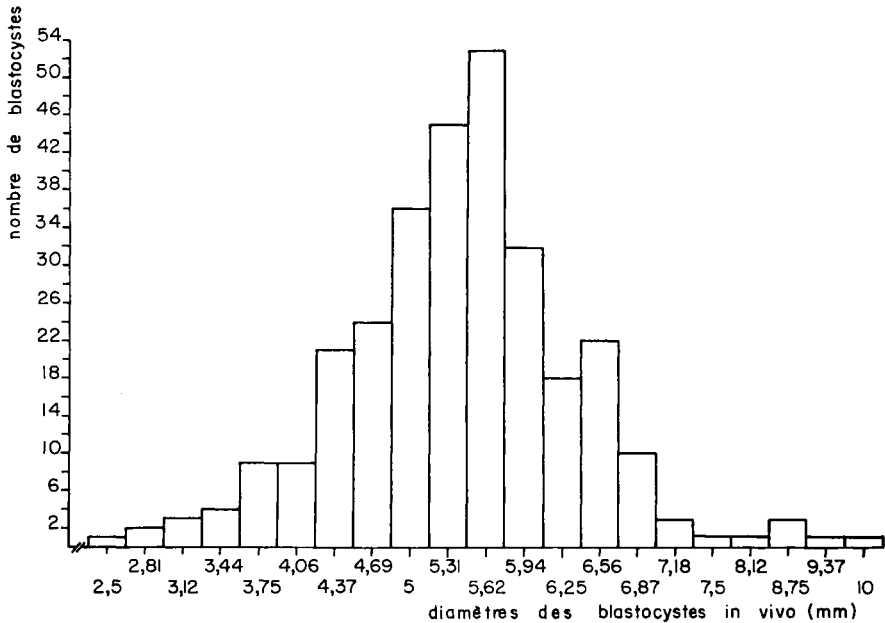


FIG. 7. — Histogramme des tailles des blastocystes ayant donné des embryons normaux à 15 jours

TABLEAU 2

*Relation entre la différenciation des hernies  
et l'espacement des blastocystes*

Différenciation des hernies	+ <sup>(1)</sup>	-- <sup>(2)</sup>	+ <sup>(1)</sup>	-- <sup>(2)</sup>
Espacement	+	—	—	+
Nombre de cornes utérines	27/49	12/49	7/49	3/49
Pourcentage	55,1	24,5	14,3	6

(<sup>1</sup>) Chaque corne utérine est gratifiée du signe + quand le pourcentage de hernies différenciées est supérieur à 50 p. 100 et

(<sup>2</sup>) du signe — quand la proportion est inférieure à 50 p. 100.

Les signes + ou — sont attribués aux cornes où l'espacement des blastocystes est régulier (<sup>1</sup>) ou irrégulier (<sup>2</sup>).

blastocystes ont été observés encore au stade I, alors que le reste de l'utérus était aux stades II et III ; ils ont dégénéré par la suite.

Leur taille *in vivo* était pourtant comprise entre 3,12 et 4,69 mm.

L'influence néfaste de l'accolement peut avoir pour origine la taille même. Les blastocystes très développés distendent l'utérus et s'immobilisent (BÖVING, 1956) avant les plus petits qui continuent à se déplacer sous l'action des contractions utérines. Il est donc possible qu'un petit blastocyste puisse se fixer à proximité d'un plus gros.

Pour juger de la préparation de l'implantation, nous n'avons pas considéré l'espacement. Cependant on trouve une bonne correspondance entre la différenciation des hernies et l'espacement (tabl. 2).

## DISCUSSION

La succession des événements qui précèdent l'implantation chez la Lapine présente une certaine analogie avec ce qui se passe chez la Ratte et la Souris.

Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation de la perméabilité vasculaire et de réaction déciduale avant l'implantation. D'après CHRISTIE (1967), la réaction déciduale commence à 8 jours 1/2 *p. c.*

La taille des blastocystes jouerait un rôle important dans la survie, en ce sens que les plus petits (< 2,5 mm) sont incapables de s'implanter ; mais parmi les autres, certains induisent avec retard la réaction de l'utérus, sans que la taille puisse être mise en cause. Cela expliquerait les dégénérescences observées juste après l'implantation (ADAMS, 1960).

On ignore les interactions entre le blastocyste et l'utérus avant et pendant l'implantation. La réceptivité de l'utérus avant l'implantation est sans doute essentielle : d'après KIRCHNER (1972) l'endomètre sécréterait avant 5 jours 18 heures *p. c.* une protéase qui pourrait être responsable de la digestion de la gloiolemma (BÖVING, 1957). Le blastocyste jouerait ensuite un rôle actif qui ne consiste pas seulement en une simple distension de l'utérus. McLAREN (1968) a observé chez la Souris l'incapacité de billes de polymère acrylique à induire la réaction déciduale ; par ailleurs DENKER (1972) a mis en évidence, chez la Lapine, l'existence d'une protéase d'origine trophoblastique qui apparaît à 6 jours *p. c.* Le blastocyste pourrait avoir une action locale sur la différenciation des chambres d'implantation.

L'espacement des blastocystes est relativement synchronisé avec la différenciation de ces chambres. Quant à la perte de la zone pellucide, sans avoir fait des expériences spéciales à ce sujet, nous avons pu constater qu'elle se produit peu de temps avant l'implantation. D'après NILSON (1970) l'endomètre a une faible activité comparativement au trophoblaste chez la Lapine, ce qui expliquerait, d'après nous, la perte tardive de la zone pellucide.

La succession des événements qui précèdent l'implantation est donc analogue à ce que RESTALL et BINDON (1971) ont décrit chez la Souris :

- espacement des blastocystes ;
- perte de la zone pellucide ;
- réaction déciduale ;

mais chez la Lapine le premier est très rapproché de l'implantation tandis que la réaction déciduale se situe après l'implantation et n'est pas liée à la perte de la zone pellucide. Chez la Souris RESTALL et BINDON reconnaissent que chaque événement peut se produire avec 6 à 8 heures d'écart ; chez la Lapine nous avons vu qu'un écart de 8 heures est possible, mais peu favorable.

Le rôle actif que le blastocyste joue dans l'implantation chez la Lapine exige que son évolution soit synchronisée avec celle de l'utérus.

Le retard dans l'induction de l'implantation indiquerait que le ralentissement des activités métaboliques de synthèse, qui permettent encore au trophoblaste de s'implanter, deviennent peu à peu incapables d'enchaîner les mécanismes qui assurent la placentation et le développement embryonnaire.

*Reçu pour publication en août 1973.*

## SUMMARY

### RELATION BETWEEN BLASTOCYST SIZE IN THE RABBIT AT IMPLANTATION AND EMBRYONIC SURVIVAL

Heterogeneity of the development observed among rabbit blastocysts at day 7 of gestation draws attention to the problem of viability of the smallest.

We studied the relationship between the size of blastocysts in the uterine horn at 160 hrs *post coitum*, the precocity of their implantation and evolution into normal embryos at day 15 of gestation.

The size of blastocysts in utero was measured using a technique which transilluminates the uterus ; the approach of implantation was measured by ПУСНОУОС' infiltration technique using Pontamine blue.

Average diameter of blastocysts visible through the uterus varied between 2.5 and 9.5 mm. Below 2.5 mm, they did not evolve into normal embryos at 15 days. Size was not the only factor involved in embryonic survival. For a total mortality of 15 p. 100, the position of blastocysts at the top or the bottom of the horns accounted for 6 p. 100, and the fact they were stuck together for 3.2 p. 100. Blastocyst size only accounted for 50 p. 100 of the remaining 5.8 p. 100.

Precocious implantation acts directly on embryonic mortality. When implantation chambers are formed at 160 hrs *post coitum*, there is an 11 p. 100 mortality and 67 p. 100 of the rabbits have a degenerate foetus, while if there is no differentiation of these chambers at 160 hrs, there is 23 p. 100 embryonic mortality and 100 p. 100 of the rabbits have a degenerate foetus.

The formation of implantation chambers and the position of blastocysts result from the conditioning of the uterus, while the role of blastocyst size and of the fact that some stick together are directly related to the blastocyst.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS C. E., HAY M. F., LUTWAK-MANN C., 1961. The action of various agents upon the rabbit embryo. *J. Embryol. exp. Morph.*, **9**, 468-491.
- ADAMS C. E., 1960. Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus Cuniculus*: the amount and distribution of loss before and after implantation. *J. Endocrin.*, **19**, 325-344.
- BOMSEL-HELMREICH O., 1965. Heteroploidy and embryonic death, in : *Preimplantation stages of pregnancy*, Wolstenholme G. E. W., O'Connor M. (eds), 246-269.
- BOVING B. G., 1954. Blastocyst uterine relationships. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **19**, 9-28.
- BOVING B. G., 1956. Rabbit blastocyst distribution. *Amer. J. Anat.*, **98**, 403-434.
- BOVING B. B., 1957. Rabbit egg coverings. *Anat. Rec.*, **127**, 270.

- CHRISTIE G. A., 1967. Histochemistry of implantation in the rabbit. *Histochemie*, **9**, 13-29.
- DENKER H. W., 1972. Blastocyst protease and preimplantation effect of ovariectomy and progesterone substitution in the rabbit. *Acta Endoc.*, **70**, 591-602.
- HAFEZ E. S. E., RAJAKOSKI E., 1964. Growth and survival of blastocysts in the domestic rabbit. I. The effect of maternal factors. *J. Reprod. Fert.*, **7**, 229-240.
- KIRCHNER C., 1972. Uterine protease activities and lysis of the blastocyst covering in the rabbit. *J. Embryol. exp. Morph.*, **28**, 177-183.
- LUTWAK-MANN C., 1971. The rabbit blastocyst and its environment physiological and biochemical aspects, in : *The biology of the blastocyst*, Blandau ed., 243-260.
- MC LAREN A., 1968. Can beads stimulate a decidual response in the mouse uterus. *J. Reprod. Fert.*, **15**, 313-315.
- NILSON O., 1970. Some ultrastructural aspects of ovoimplantation, in : *Ovo. implantation, human gonadotropins and prolactin*, Hubinont, Leroy, Robyn, Leleux, éd.
- ORSINI M. W., 1962. Technique of preparation, study and photography of benzylbenzoate cleared material for embryological studies. *J. Reprod. Fert.*, **3**, 283-287.
- PSYCHOYOS A., 1960. Nouvelle contribution à l'étude de la nidation de l'œuf chez la Ratte. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **251**, 3073-3075.
- RESTALL B. J., BINDON B. M., 1971. The timing and variation of preimplantation events in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, **24**, 423-426.