

ÉVOLUTION DU DÉCIDUOME EXPÉRIMENTAL ET DU BLASTOCYSTE EN LÉTHARGIE CHEZ LA RATTE

II. — ÉVOLUTION DU BLASTOCYSTE EN LÉTHARGIE

H. DUPONT, C. ESNAULT*, Anne-Josette DULUC et G. MAYER
avec la collaboration technique de Liliane DESPUYOS (I. N. S. E. R. M.)
et J. C. NICOLLE (I. N. R. A.)

*Laboratoire d'Histologie et Embryologie,
Université de Bordeaux II,
146, rue Léo-Saignat,
33076 Bordeaux*

** Station de Physiologie de la Reproduction,
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,
Nouzilly 37380 Monnaie*

RÉSUMÉ

L'action de la progestérone et de l'œstradiol sur les divisions cellulaires des blastocystes en léthargie est étudiée par des techniques de cytogénétique et de cytophotométrie. Le blastocyste en léthargie ne présente aucune synthèse d'ADN. L'œstradiol a pour effet de lever cette inhibition et de relancer le cycle.

L'ovoimplantation normale, chez la Ratte, a lieu l'après-midi du jour 5. Elle est le résultat de l'intervention de la progestérone et d'une sécrétion accrue d'œstrogène dans la 2^e moitié de la progestation [5] [10]. Dans ces conditions la muqueuse utérine acquiert un maximum de sensibilité le jour 5 [1]. Toute intervention qui supprime cet apport œstrogénique [5] en maintenant dans l'économie la présence de progestérone, provoque la léthargie des blastocystes qui restent libres dans la cavité utérine et ne peuvent s'implanter.

Nous avons étudié l'évolution des blastocystes au cours de l'implantation retardée par des techniques de cytogénétique et de cytophotométrie adaptées à ce matériel.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

1. — *Obtention des œufs en léthargie*

L'ovariectomie bilatérale pratiquée le jour 4 de la grossesse suivie d'une injection quotidienne de 5 mg de progestérogène en suspension dans l'huile d'arachide maintient les œufs libres dans l'utérus sans qu'ils puissent s'implanter.

2. — *Récolte des blastocystes*

Celle-ci est réalisée à différents moments du 5^e au 15^e jour après la fécondation, par lavage des cornes utérines au moyen d'une solution physiologique et canulation intravaginale au moyen d'un cathéter en polyéthylène.

2. — *Technique de cytogénétique*

Pour obtenir le blocage des mitoses, de la colchicine a été injectée à la mère, par voie intrapéritonéale, à la dose de 1 µg/g de poids, 4 h avant la récolte des œufs. Les blastocystes sont placés sur une lame dans une goutte d'une solution hypotonique de citrate de sodium. La concentration ou le temps d'hypotonie varient en fonction de la taille des blastocystes.

Une à deux gouttes de Carnoy suffisent pour une bonne dissociation du blastocyste. Les préparations sont ensuite colorées au Giemsa tamponné à pH 6,7.

Cette technique présente 2 avantages :

- un bon étalement chromosomique des métaphases qui permet la réalisation du caryotype et une numération aisée des mitoses ;
- une bonne dispersion des noyaux débarrassés de tout contaminant cytoplasmique favorable à la microspectrophotométrie par balayage.

4. — *Technique cytophotométrique*

Des blastocystes prélevés au jour 5 de l'implantation normale sont soumis à des temps d'hydrolyse HCl N à 60°C de 6', 8', 10', 12', 14', 20', puis colorés par le réactif de Schiff. Les mesures nucléaires au micro-spectrophotomètre pour chaque temps d'hydrolyse montrent une extinction optimale du complexe colorant-ADN pour un temps d'hydrolyse de 8 minutes.

Les mesures sont réalisées en lumière monochromatique à 560 mµ sur un « Universalmikrospektrophotometer UMSPi Zeiss » à platine rapide selon la technique par balayage.

RÉSULTATS

Nous avons étudié l'action de la progestérogène et de l'œstradiol sur les divisions cellulaires des blastocystes en léthargie chez la Ratte ovariectomisée le jour 4 [2].

— Chez les Rattes ovariectomisées ne recevant aucun traitement hormonal, le nombre de cellules des blastocystes est en moyenne moins élevé que dans la série recevant de la progestérogène et les variations du nombre de cellules à partir du 8^e jour sont plus importantes.

— Chez les Rattes ovariectomisées et recevant une injection quotidienne de 5 mg de progestérogène, on note une meilleure survie embryonnaire.

Les blastocystes continuent à se développer pendant les jours 6 et 7. Cette croissance se ralentit au 8^e jour où elle atteint un palier qui n'est pas absolument rectiligne car de rares mitoses sont observées jusqu'au jour 15.

Nous avons compté le nombre de mitoses et l'avons rapporté au nombre total de cellules. La poussée mitotique est importante le jour 6, et se ralentit le jour 7.

Une injection de 0,1 μg d'œstradiol le 10^e jour provoque l'implantation des œufs dans les 48 heures.

— 24 heures après l'injection de très rares mitoses sont observées, mais la majorité des blastocystes ne présente aucune division.

— 48 heures après l'injection d'œstradiol, les blastocystes non encore implantés montrent une intense activité mitotique.

L'étude cytophotométrique de l'ADN-Feulgen précise ces résultats [3].

— Chez les Rattes en gestation normale, les blastocystes prélevés l'après-midi du jour 5 synthétisent activement l'ADN.

— Chez les Rattes ovariectomisées le jour 4 et injectées quotidiennement de Progestérone, les noyaux des blastocystes prélevés aux jours 9 et 15 ne présentent aucune synthèse d'ADN. Les noyaux sont en G_1 ou G_2 .

— 24 heures après l'injection d'œstradiol, les noyaux sont en G_1 ou G_2 .

— 42 heures après, on observe une reprise importante des synthèses d'ADN.

DISCUSSION

Des études précédentes par autoradiographie ont montré qu'une dose d'œstrogène administrée à des animaux ovariectomisés et traités par la progestérone augmente l'activité synthétique de l'ADN, ARN et des protéines des noyaux des blastocystes en léthargie [6, 7, 8, 9].

La cytophotométrie par balayage permet d'explorer la totalité du blastocyste et de mesurer avec précision les valeurs en ADN-Feulgen des noyaux au cours du cycle cellulaire.

Du jour 5 au jour 7 du fait de l'asynchronisme des cycles, le rythme de synthèse d'ADN diminue pour être pratiquement nul au jour 9. Certains noyaux en G_2 ont encore la possibilité d'effectuer les synthèses d'ADN et de protéines chromosomiques nécessaires au déroulement de la mitose.

Ces noyaux issus de G_2 entrent alors dans une phase G_1 qui peut être considérée comme une très longue présynthèse ou assimilée à la phase G_0 de LAJTHA et QUASTLER [4]. Pour ces auteurs, les cellules peuvent quitter le cycle cellulaire et entrer dans un stade G_0 . GELFANT [4] dans l'épiderme de Souris a montré que des noyaux peuvent rester bloqués en G_1 ou G_2 .

L'œstrogène aurait pour effet de lever cette inhibition et de relancer le cycle de synthèse de l'ADN.

*Colloque D. G. R. S. T., Biologie de la Procréation.
Paris 7-8 mars 1975.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide de la D. G. R. S. T., contrat n° 71-7-3247.

SUMMARY

EVOLUTION OF EXPERIMENTAL, DECIDUA
AND DORMANT BLASTOCYSTS IN THE FEMALE RAT.

II. — EVOLUTION OF DORMANT BLASTOCYST

The action of Progesterone or oestradiol upon cell divisions in dormant blastocysts of castrated progestant rats was studied with cytophotometric and cytogenetic techniques. DNA synthesis does not occur during the diapause of the blastocyst. Oestradiol remove the inhibition and DNA synthesis is then starting again.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] DE FEO, 1963. Determination of the sensitive period for the induction of deciduomata in the Rat by different inducing procedures. *Endocrinology*, **73**, 488-497.
- [2] DUPONT H., DULUC A. J., MAYER G., 1970. Action de la progestérone et de l'œstrogène sur les divisions cellulaires des blastocystes en léthargie chez la Ratte ovariectomisée. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **270**, D, 2118-2121.
- [3] DUPONT H., ESNAULT C., DULUC A. J., MAYER G., 1975. Détermination par cytophotométrie de la teneur relative en acide désoxyribonucléique des noyaux du blastocyste en implantation normale et retardée chez la Ratte ovariectomisée. *C. R. Soc. Biol.*, (sous presse).
- [4] EPIFANOVA O. I., TERSKIKE V. V., 1969. On the resting periods in the cell life cycle. *Cell Tissue Kinet*, **2**, 75-93.
- [5] MAYER G., 1963. The experimental control of ovum implantation. In : *Techniques in Endocrine Research*. Acad. Press. London, 245-259.
- [6] PRASAD M. R. N., DASS C. M. S., MOHLA S., 1968. Action of oestrogen on the blastocyst and uterus in delayed implantation — on autoradiographic study. *J. Reprod. Fert.*, **16**, 97-104.
- [7] PSYCHOYOS A., BITTON-CASIMIRI V., 1969. Captation *in vitro* d'un précurseur d'acide ribonucléique (ARN) (uridine-5-³H) par le blastocyste du rat ; différences entre blastocystes normaux et blastocystes en diapause. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **268**, 188-190.
- [8] SANYAL M. K., MEYER R. K., 1969. Desoxyribonucleic acid synthesis *in vitro* preimplantation blastocysts of prepuberal rats ovulated with gonadotrophins. *Endocrinology*, **85**, 585-589.
- [9] SANYAL M. K., and MEYER R. K., 1970. Effect of estrone on DNA synthesis in preimplantation blastocysts of gonadotrophin-treated immature rats. *Endocrinology*, **86**, 976-981.
- [10] YOSHINAGA K., HAWKINS R. A., STOCKER J. F., 1969. « Estrogen secretion by the rat ovary *in vivo* during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*, **85**, 103-112.