

Obtention de blastocystes après maturation et fécondation «in vitro» d'ovocytes de bovin : premiers résultats

ECTORS F.J., VAN DER ZWALMEN P., TOUATI K., BECKERS J.-F.,
ECTORS F.

*Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège.
Service d'obstétrique et des troubles de la reproduction.
Rue des Vétérinaires, 45
1070 Bruxelles*

Actuellement, la transplantation embryonnaire devient une méthode de reproduction de plus en plus utilisée dans l'élevage bovin. Quoique très performante, cette technique ne permet de récupérer qu'une partie du capital de reproduction présent au niveau de l'ovaire. C'est ainsi que de nombreux chercheurs se sont attachés à récupérer les ovogonies, soit par endoscopie soit par prélèvement à l'abattoir (1, 2, 3). Cette façon de procéder impose évidemment la connaissance des techniques de maturation de l'ovocyte, de fécondation «in vitro» et de développement des premiers stades de l'embryon. Outre les intérêts économiques, cette méthode autorise, grâce à l'obtention d'un grand nombre de stades précoces, le développement de techniques de clonage et de transfert de gènes (7).

La maîtrise de ces différents paramètres est actuellement malaisée, c'est pourquoi nous avons tenté d'en améliorer le rendement.

MATERIEL ET METHODES

Récoltes des ovocytes

Les follicules de 1 à 5 mm sont ponctionnés à un stade quelconque du cycle œstral dans les 15 minutes qui suivent l'abattage.

Les ovocytes sont collectés dans 5 ml de Ham's F10 Hépès, à 38° C. La sélection de ceux-ci est effectuée au laboratoire dans les deux heures qui suivent. Seuls sont retenus les ovocytes entourés de deux à trois couches de cellules de la granuleuse ou seulement de leur corona.

Maturation des ovocytes

Des groupes de 15 ovocytes sont mis en culture dans du Ménézo B₂, complété par 2 à 5 × 10⁶ de cellules de granuleuse par ml. La

culture s'effectue à 38° C sous atmosphère de 5 % de CO₂ (2).

Pour tenter de reproduire l'environnement hormonal du follicule préovulatoire, ce milieu est complété, après 6 heures, de 10 µl de LH/FSH (5 µg/0.5 µg par ml) (4).



Fig. 1 : Ovocyte immature.

La durée totale de la culture est de 27 heures. Passé ce délai, les ovocytes sont considérés comme matures, quand ils répondent aux critères suivants :

- expansion du cumulus
- apparition du premier globule polaire
- augmentation de l'espace périvitellin
- modifications cytoplasmiques : éclaircissement périphérique, condensation centrale

Fécondation

La fécondation est effectuée à partir de sperme congelé, capacité selon la méthode de

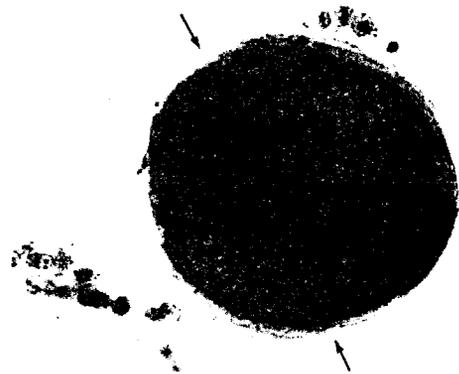


Fig. 2 : Ovocyte fécondé (→ pronucléus).

Parrish (5). Celle-ci consiste d'abord en une sélection des spermatozoïdes les plus mobiles par migration ascendante suivie d'une capacitation par exposition dans une solution de 500 µl de Tyrode contenant 500 µg d'héparine et 20 µl de P.H.E. (Pénicillamine, Hypotaurine, Epinéphrine).

Après réaction acrosomiale, les ovocytes sont additionnés au milieu et restent au contact des spermatozoïdes pendant 16 heures.

Culture

Les zygotes sont partiellement débarrassés par lavage de leur cumulus et des spermatozoïdes surnuméraires, avant d'être cultivés à 38° C dans du Ménézo B₂ complété par 10 % de sérum artificiel (Ultraser G, Gibco).

Après 24 heures, 50 % des embryons sont transférés pour 5 jours dans l'oviducte d'une lapine pseudogestante, tandis que les autres sont laissés en culture.

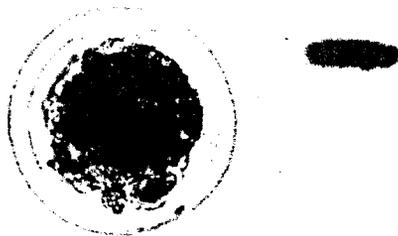


Fig. 3 : Jeune blastocyste obtenu après passage dans l'oviducte de lapine.

Fixation

Après maturation et fécondation, une partie des ovocytes ou zygotes est fixée dans une solution de méthanol/acide acétique (3/1, v/v) et colorée à l'orcéine en vue de l'examen histologique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre expérimentation a porté sur 527 ovocytes, dont 95 % ont poursuivi leur maturation. 78 % de ceux-ci ont été fécondés, si bien que le pourcentage d'embryons obtenus est de 74,4 %.

Le transfert de ces stades précoces dans l'oviducte de lapine a permis d'obtenir des morulas et des blastocystes. Ceux-ci ont été congelés et transférés à des receveuses.

L'utilisation de lapines comme moyen de culture des stades précoces constitue une entrave assez importante au dévelop-

pement de la méthode. La croissance d'embryons sur culture de cellules de granuleuse ou de cellules tubaires permettra probablement une simplification de la méthode (6).

REMERCIEMENTS

Tous nos remerciements vont à Messieurs Greve, Calledsen, et Chupin pour les conseils qu'ils nous ont apportés.

Nous tenons également à remercier les abattoirs Viangros pour l'accueil qu'ils nous ont réservé.

BIBLIOGRAPHIE

1. BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F., DRESSEL M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 1982, **27**, 147.
2. LU K.H., GORDON I., GALLAGHER M., Mc GOVERN H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *Veterinary Record*, 1987, **121**, 259.
3. XU K.P., GREVE T., CALLESEN H., HYTTTEL P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matures and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 1987, **81**, 501.
4. STUBBINGS R.B., BETTERIDGE K.J. & BASRUR P.K. Investigations of culture requirements for bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*, 1988, **29**, 313.
5. PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J.L., LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L., CRITSER E.S., EYESTONE W.H., FIRST N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 1986, **25**, 591.
6. FUKUI Y., ONO H. In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilised bovine oocytes. *Veterinary Record*, 1988, **122**, 282.
7. FIRST N.L., PARRISH J.J. In vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert.*, 1987, Suppl. **34**, 151.

SUMMARY

Development to blastocyst of in vitro matured and fertilised bovine oocytes : first results.

74,4 % of two-cells cow embryos are following in vitro maturation and fertilisation. Some embryos developed in rabbit's oviducts to morula and blastocyst stages. They were frozen and thawed before transfert in receptors.