

15-41



7 Mars 1990

FECONDATION ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE

CHEZ LA JUMENT

par Jacqueline BEZARD, G. DUCHAMP,
Michèle MAGISTRINI et E. PALMER
Station de Physiologie de la Reproduction
I.N.R.A.
37380 - NOUZILLY

Résumé

Le développement embryonnaire précoce chez la jument a été étudié après induction de l'ovulation et contrôle précis par échographie (65 % ovulent entre 34 et 40 h post-induction).

Les embryons étaient collectés à 6 h (n=6), 12 h (n=4), 24 h (n=4), 48 h (n=3), 72 h (n=5) et 96 heures post-ovulation (n=2). Ils étaient observés ou mis en culture puis fixés pour histologie.

La séquence du développement naturel a été précisée : 1 cellule à 6 h et 12 h, 2 à 24 h, 4 à 6 à 48 h, 7 à 11 à 72 h et 8 à 12 cellules à 96 heures. Après 24 à 84 h de culture, le développement était le même qu'in vivo.

De points importants pour la fécondation in vitro ont ainsi été précisés : moment pour la ponction d'un follicule juste avant l'ovulation, développement normal et conditions de culture pour l'embryon équin.

MOTS CLES : FECONDATION - DEVELOPPEMENT - EMBRYON - CULTURE - EQUIN.

Summary

Early embryonic development in the mare was studied after induction of ovulation and its precise detection by ultrasonography (65% ovulate between 34 and 40h post-induction).

Embryos were collected at different intervals from ovulation, 6h (n=6), 12h (n=4), 24h (n=4), 48h (n=3), 72h (n=5) and 96h (n=2). They were observed or cultured and fixed for histology.

Chronology of in vivo development has been precised at collection: 1 cell at 6 and 12 h, 2 at 24 h, 4 to 6 at 48 h, 7 to 11 at 72 h and 8 to 12 cells at 96 hours. After 24 to 84 h of culture, the development was the same as in vivo.

Important points for in vitro fertilization have been precised: right time for follicular puncture just before ovulation, reference of normal embryonic development and culture conditions for equine embryos.

KEY- WORDS : FERTILIZATION - DEVELOPMENT - EMBRYO - CULTURE - EQUINE.

© - CEREOPA 1990

1541

INTRODUCTION

La séquence de développement des très jeunes embryons chez la jument n'avait pas été particulièrement étudiée à ce jour. Les seuls embryons décrits dans la bibliographie étaient issus de juments chez qui les inséminations et les détections d'ovulations étaient peu précises (HAMILTON et DAY, 1945 ; WEBEL et al., 1977 ; BETTERIDGE et al., 1982 ; MCKINNON et al., 1988 ; FLOOD et al., 1982 et ENDERS et al., 1987). L'analyse d'une séquence de développement à partir de ces données était donc approximative. Nous l'avons rendue plus précise en cherchant à connaître le moment d'ovulation à ± 1 heure chez des juments inséminées 19 à 25 heures auparavant. Les embryons étaient collectés à des moments précis pour être analysés et certains d'entre eux ont été mis en culture. Le développement *in vitro* de ces embryons fécondés *in vivo* a ensuite été analysé et comparé au développement naturel.

Ces études apportent des éléments indispensables aux programmes de fécondation *in vitro* : 1° déterminer le moment précis d'ovulation pour pouvoir collecter des ovocytes juste avant celle-ci, 2° connaître le développement naturel des embryons pour juger ceux obtenus par fécondation *in vitro*, 3° disposer d'une méthode de culture permettant un développement normal des embryons avant transfert.

MATERIEL ET METHODES

- Induction et contrôle d'ovulation

Pendant la saison sexuelle, 22 ponettes (20 Shetland et 2 Welsh) étaient échographiées régulièrement pour suivre la croissance folliculaire : toutes les 48 h jusqu'à un diamètre de follicule de 25 mm, puis toutes les 24 h. A 33 mm, l'induction de l'ovulation était réalisée en injectant, par voie intraveineuse, 25 mg d'extraits d'hypophyses équine (DUCHAMP et al., 1987) entre 21 h 00 et 23 h 00. La jument était ensuite échographiée toutes les heures à partir de 34 h post-injection jusqu'à l'ovulation.

- Collecte des embryons

Les juments étaient inséminées entre 19 h et 25 h après l'injection d'extrait hypophysaire (soit 15 à 20 h avant l'ovulation présumée) par 200×10^6 spermatozoïdes fraîchement éjaculés et dilués dans 10 ml de milieu HHBSA (composé de sels de Hanks, additionnés de 20 mM de tampon Hépès et de 1 % de Sérum Albumine Bovine à pH 7,1). Une laparotomie par le flanc sous anesthésie générale (gaïacol et hallothane) était réalisée 6, 12, 24, 48, 72 et 96 heures après l'ovulation. L'ovaire et l'oviducte du côté de l'ovulation étaient prélevés. L'oviducte était disséqué rapidement sous une hotte à flux laminaire à 37°C et perfusé avec une solution saline stérile (Dulbecco + 100 ui/ml d'héparine + 100 ui/ml de pénicilline + 100 µg/ml de streptomycine). Les oeufs fraîchement ovulés étaient repérés sous la loupe binoculaire dans un incubateur à 37°C (Leitz).

- Observations des embryons

Les oeufs étaient rincés immédiatement dans 3 bains de solution saline puis transférés dans une boîte stérile contenant 0,5 ml de milieu de culture (B2 INRA additionné de 15 % de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur + antibiotiques identiques au milieu de perfusion). Ils étaient observés très rapidement au microscope inversé aux grossissements 40, 100, 200 et 400 puis photographiés. Leur aspect et le nombre de cellules étaient notés. Ils étaient ensuite, soit transférés en tube stérile dans 0,5 ml de milieu de culture (décrit plus haut), soit fixés pour l'histologie fine (glutaraldéhyde 2 % dans 0,175 M de tampon cacodylate de Na à pH 7,3, post fixés dans l'acide osmique 2 %, déshydratés dans l'alcool puis inclus dans l'épon 812). L'histologie fine était réalisée sur coupes semifines sériées de 1 μ d'épaisseur colorées à chaud au bleu de toluidine. Des coupes ultrafines de 100 m μ étaient exécutées à différents niveaux du specimen, contrastées au citrate de plomb et acétate d'uranyl pour être observées au microscope électronique.

- Culture des embryons

Douze embryons (5 collectés à 6 h, 4 à 12 h, 2 à 24 h, 1 à 48 heures post-ovulation) ont été cultivés pendant une durée variable de 24 h à 84 h. La culture était réalisée en tubes de 5 ml contenant chacun un embryon dans 0,5 ml de milieu sous passage continu d'air + CO₂ (5 %) saturé d'eau. Ces tubes étaient maintenus dans un bain-marie de 38,5°C. Toutes les 24 heures, les embryons étaient transférés dans du milieu frais dans une boîte de culture pour être rapidement observés et photographiés au microscope inversé. Ils étaient ensuite replacés en tube pour reprendre la culture. En fin d'expérience, les embryons étaient fixés pour analyses morphologiques fine et ultrafine.

RESULTATS

1 - Moment d'ovulation après induction par injection d'extrait hypophysaire (Figure 1).

L'induction d'ovulation était réalisée sur 44 cycles. Dans 37 cas (84 %), les juments ont ovulé : 10 (27 %) précocement entre 0 et 34 h post-induction (p.ind.) avant la période où l'échographie était faite toutes les heures, 24 (65 %) entre 34 et 40 h p.ind. et 3 (8 %) tardivement entre 40 et 47 heures. Dans 4 cas (9%), le follicule préovulatoire s'est lutéinisé sans ovuler et, dans 3 autres (7 %), les juments n'ont présenté ni ovulation ni lutéinisation du follicule et sont entrées en période d'inactivité ovarienne.

2 - Collecte des oeufs et stade de développement

Après perfusion de 32 oviductes à différents moments après l'ovulation, 24 oeufs (ovocytes récemment ovulés ou embryons) ont été récupérés (75 %) ainsi que 16 vieux ovocytes originaires de cycles précédents.

Le stade de développement des 24 oeufs est montré dans la figure 2 et les photographies caractéristiques de chaque âge sont présentées dans la figure 3.

- 6 heures après l'ovulation (Fig. 3a) : les 6 oeufs étaient tous constitués d'1 cellule entourée d'un cumulus épais empêchant l'observation précise au microscope inversé et la vérification de la fécondation. Un oeuf fixé immédiatement et analysé en histologie était fécondé (présence du noyau mâle).

- 12 heures après l'ovulation (Fig. 3b) : les 4 oeufs collectés avaient perdu suffisamment de cumulus pour repérer clairement 1 cellule avec 2 globules polaires prouvant la fécondation. Le flagelle du spermatozoïde fécondant était repéré au microscope électronique (Fig. 3o).
- 24 heures après l'ovulation (Fig. 3c) : tous les oeufs étaient complètement dénudés de leur cumulus, 3 des 4 oeufs s'étaient divisés en 2 cellules indiquant la fécondation et 1 n'avait toujours qu'une seule cellule (son étude histologique a montré la présence d'une métaphase II, stade nucléaire de l'ovocyte qui persiste en l'absence de fécondation Fig. 3m).
- 48 heures après l'ovulation (Fig. 3d) : les 3 embryons avaient respectivement 4, 5 et 6 cellules.
- 72 heures après l'ovulation (Fig. 3e) : 4 embryons avaient 7, 8, 10 et 11 cellules et 1 n'avait qu'une cellule (son analyse ultérieure a montré qu'il n'avait pas été fécondé).
- 96 heures après l'ovulation (Fig. 3f) : les 2 embryons avaient 8 et 12 cellules.

Quel que soit l'âge des embryons, très peu de spermatozoïdes étaient trouvés accrochés à la zone pellucide. Parmi les 6 oeufs collectés à 6 h post-ovulation (p.ov.), 3 oeufs étaient fécondés (50 %) d'après l'observation histologique. Parmi les 18 oeufs collectés à partir de 12 h p.ov., 16 étaient fécondés (89 %). A partir de 24 h p.ov., tous les embryons présentaient un important matériel extracellulaire dans l'espace périvitellin (Fig. 3c, d et n).

3 - Développement en culture des embryons

Les résultats sont présentés dans la figure 2. Les âges des embryons au début de la culture étaient 6 h, 12 h, 24 h et 48 h p.ov.. Le temps de culture était variable selon les échantillons (24 h à 84 h). Les observations successives étaient réalisées toutes les 24 heures.

a - Observations à l'âge de 24 h

Parmi les 9 oeufs mis en culture à 6 h et 12 h p.ov. jusqu'à 24 h, 3 n'étaient pas divisés et ne sont pas divisés ultérieurement, 5 étaient divisés en 2 cellules et 1 en 4 cellules. Les oeufs divisés étaient à un stade identique à celui des 3 embryons collectés à l'âge de 24 h p.ov. alors que les non divisés n'étaient pas fécondés à la mise en culture (confirmation après histologie).

b - Observations à l'âge de 48 h

Parmi les 7 embryons cultivés entre 24 h et 48 h p.ov., tous se sont divisés et ont atteint un stade (4 à 7 cellules) identique à celui des 3 embryons collectés à 48 h p.ov. (4 à 6 cellules).

c - Observations à l'âge de 72 h

Les 4 embryons cultivés entre 48 et 72 h p.ov. se sont segmentés mais seulement 3 ont atteint le stade 7 à 8 cellules comparable à celui des 4 embryons collectés à 72 h p.ov. (7 à 11 cellules). Le quatrième a ralenti sa croissance et n'était qu'à 5 cellules après culture.

d - Observations à l'âge de 96 h

Seulement 2 embryons ont été cultivés entre 72 h et 96 h p.ov. ; ils ont atteint un stade de 12 à 14 cellules comparable à celui des 2 embryons collectés à 96 h p.ov. (8 et 12 cellules).

La planche photographique (Fig. 3g à l) présente les photographies successives de 2 embryons après culture. A partir de 24 h p.ov., un important matériel extracellulaire était trouvé après culture comme chez les embryons du même âge avant culture.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Après induction d'ovulation par extrait hypophysaire, le contrôle par échographie a montré que 65 % des juments ovulent entre 34 h et 40 h post-induction : donnée fondamentale pour décider du moment précis de ponction du follicule préovulatoire en vue d'obtenir un ovule mûr pour la fécondation in vitro. Une précédente étude (PALMER et al., 1987) sur la ponction folliculaire 36 h après hCG ou extrait hypophysaire a montré que la plupart des ovocytes récupérés étaient en métaphase II confirmant la maturation nucléaire. La plupart des ovulations produites avant 34 h sont supposées être des ovulations spontanées, n'ayant pas été programmées par le traitement d'induction. La variabilité des réponses n'était pas liée au diamètre du follicule au moment de l'injection ($R=0,15$; $N=37$). Dans 8 % des cas, les ovulations étaient tardives entre 40 et 47 h post-induction ; ces animaux n'auraient probablement pas libéré d'ovocyte au cours d'une ponction 34 h p.ind., les follicules étant immatures car programmés à ovuler tardivement. Dans 16 % des cycles induits, le follicule préovulatoire s'est lutéinisé et n'a pas ovulé expliquant probablement l'absence de récupération de certains ovocytes lors de ponctions folliculaires (PALMER et al., 1987), les ovocytes restants attachés au mur du follicule.

A chaque moment de collecte, nous avons constaté une bonne homogénéité des stades de développement des différents embryons. La séquence de développement naturel est précise : 1 cellule à 6 h et 12 h, 2 cellules à 24 h, 4 à 6 cellules à 48 h, 7 à 11 cellules à 72 h et 8 à 12 cellules à 96 h.

Les segmentations obtenues dans notre système de culture semblent se dérouler au même rythme que in vivo au moins pendant une période de 48 heures. Cette méthode de culture (milieu B2 + 15% de sérum de veau foetal, 38,5°C et sous air + 5 % CO₂) qui permet le développement normal des embryons sera utilisée en fécondation in vitro.

BIBLIOGRAPHIE

- BETTERIDGE K.J., EAGLESOME M.D., MITCHELL D., FLOOD P.F. et BERIAULT R., 1982. Development of horse embryos up to 22 days after ovulation: observations on fresh specimens. *J. Anat.* 135, 191-209.
- DUCHAMP G., BOUR B., COMBARNOUS Y. et PALMER E., 1987. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35, 221-228.
- ENDERS A.C., LIU I.K.M., BOWERS J., LANTZ K.C., SCHLAFKE S. et SUAREZ S., 1987. The ovulated ovum of the horse: cytology of non-fertilised ova to pronuclear stage ova. *Biol. Reprod.* 37, 453-466.
- FLOOD P.F., BETTERIDGE K.J. et DIOCEE M.S., 1982. Transmission electron microscopy of horse embryos 3-16 days after ovulation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32, 319-327.
- HAMILTON W.J. et DAY F.T., 1945. Cleavage stages of the ova of the horse, with notes on ovulation. *J. Anat.* 79, 127-133.
- McKINNON A.O. et SQUIRES E.L., 1988. Morphologic assessment of the equine embryo. *J.A.V.M.A.* 192, 401-406.
- PALMER E., DUCHAMP G., BEZARD J., MAGISTRINI M., KING W.A., BOUSQUET D. et BETTERIDGE K.J., 1987. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. *J. Reprod. Fert.* 35, 689-690.
- WEBEL S.K., FRANKLIN V., HARLAND B. et DZIUK P.J., 1977. Fertility, ovulation and maturation of eggs in mares injected with hCG. *J. Reprod. Fert.* 51, 337-341.

Figure 1 : Répartition des ovulations en réponse à l'injection d'extrait hypophysaire.

Distribution of ovulations after pituitary extract injection.

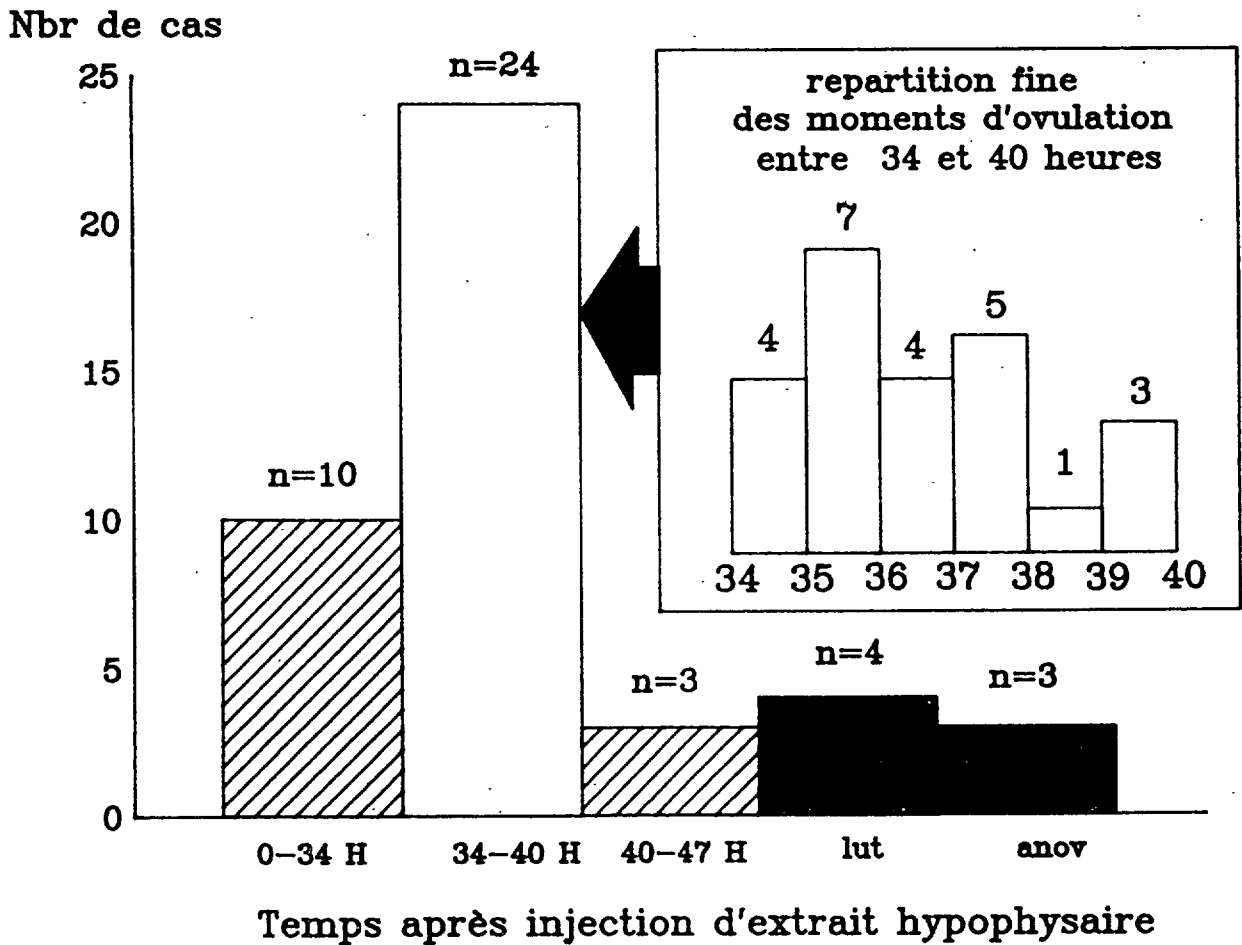


Figure 2 : Stades de développement (nombre de cellules) d'embryons équins collectés entre 6 et 96 heures post-ovulation et cultivés pendant 0 à 84 heures.

Development stages (cell number) of equine embryos collected between 6 and 96 hours post-ovulation and cultured during 0 to 84 hours.

Moment de la collecte (h post-ovulation)	Moments des observations (h post-ovulation)						
	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
6 h	1						
	1	→	1	→	1		
	1	→	1	→	1		
	1	→	1	→	1		
	1	→	2	→	4		
	1	→	2	→	5		
12 h		1	→	2	→	6	
		1	→	4	→	7	
		1	→	2	→	6	
		1	→	2	→	4	
					→	7	
					→	8	
						→	12
24 h			2				
			2				
			1	→	1		
			2	→	4	→	5
48 h				4			
				6			
				5	→	8	
					→	14	
72 h					1		
					7		
					8		
					10		
					11		
96 h						8	
						12	

Chaque ligne représente les observations du même embryon. Le stade à la collecte est en caractères gras et les périodes de culture sont matérialisées par des flèches.

Figure 3 : Photographies d'embryons équins collectés à différents âges après l'ovulation, examinés in toto ou en histologie, immédiatement ou après culture.

Photographs of equine embryos collected at different intervals after ovulation and examined in toto or after histology, immediately or after culture.

- a (x200): 6 heures p.ov. 1 cellule entourée de cumulus.
- b (x230): 12 heures p.ov. 1 cellule en présence de 2 globules polaires (gp) confirmant la fécondation.
- c (x220): 24 heures p.ov. 2 cellules et important matériel extracellulaire (me).
- d (x230): 48 heures p.ov. 4 cellules, matériel extracellulaire et spermatozoïdes (→).
- e (x230): 72 heures p.ov. 8 cellules.
- f (x240): 96 heures p.ov. 12 cellules.
- g à i: embryon collecté à 12 heures p.ov. et cultivé pendant 84 heures.
 - g (x220) 1 cellule, h (x240) après 12 heures de culture 2 cellules,
 - i (x230) après 84 heures de culture 12 cellules.
- j à l: embryon collecté à 48 heures p.ov. et cultivé pendant 48 heures.
 - j (x220) 5 cellules, k (x240) après 24 heures de culture 8 cellules,
 - l (x230) après 48 heures de culture 14 cellules.
- m (x680): histologie de coupe semifine d'un oeuf de 24 heures p.ov. non fécondé, le noyau au stade métaphase II (m) prouve l'absence de fécondation.
- n (x360): histologie de coupe semifine d'un oeuf de 48 heures p.ov., 2 cellules sont visibles avec noyau (n) et matériel extracellulaire (me).
- o (x16000): microscopie électronique d'un oeuf de 12 heures p.ov., la fécondation est prouvée par la présence d'un flagelle de spermatozoïde (spz) dans le cytoplasme de l'oeuf.

Figure 3

