

Contenu en ATP et en ADN mitochondrial des ovocytes issus de vaches sélectionnées pour leur aptitude à la production d'embryons *in vitro*

Quantification of ATP and mitochondrial DNA in oocytes recovered from cows with known *in vitro* embryo production

M. TAMASSIA (1), Y. HEYMAN (2), J-P. RENARD (2), M. STOJKOVIC (3), E. WOLF (3), P. MAY-PANLOUP (4), P. REYNIER (4) AND S. CHASTANT-MAILLARD (1)

(1-2) U.M.R. 1198 INRA/ENVA Biologie du Développement et Reproduction

(1) Equipe Développement et Biotechnologies, Ecole Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort, France.

(2) Equipe Embryon et Biotechnologies, INRA, 78352 Jouy en Josas Cedex, France.

(3) University of Munich, Department of Molecular Animal Breeding Biotechnology, D-85764 Oberschleissheim, Allemagne

(4) INSERM EMI-U 00-18, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU d'Angers, 49033 Angers, France

INTRODUCTION

Nous avons démontré récemment l'effet individuel de la vache donneuse d'ovocytes sur le taux de formation d'embryons *in vitro* (Tamassia *et al.*, 2001). L'origine de cet effet maternel reste inconnue. Pour assurer les besoins énergétiques de l'embryon, l'ovocyte accumule une grande quantité de mitochondries (Cummins, 1998) et un stock d'ATP (Van Blerkom *et al.*, 1995). L'objectif de cette étude a été de rechercher une éventuelle corrélation entre la quantité d'ATP et d'ADN mitochondrial (ADNmt) dans l'ovocyte et le taux de blastocystes obtenus *in vitro*.

1. MATERIEL ET METHODES

La collecte d'ovocytes a été faite par ovum pick-up, deux fois par semaine pendant 10 et 12 semaines sur six vaches Prim'Holstein de capacité à la production d'embryons *in vitro* connue. Les stocks ovocytaires d'ATP ont été mesurés avant (stade Vésicule Germinative) et après maturation *in vitro* (Métaphase II) (Tamassia *et al.*, 2001) à l'aide d'un kit commercial basé sur la réaction luciférine - luciférase (kit Floride-fl-asc; Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Pour la quantification des mitochondries, l'ADNmt a été extrait de chaque ovocyte en utilisant le kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Pour déterminer le nombre de copies d'ADNmt, les PCRs ont été effectuées à l'aide du LightCycler-Roche en utilisant le kit "LightCycler-Faststart DNA master SYBR Green 1" (Roche, Mannheim, Allemagne). La position des primers dans l'ADNmt est : DC3 (5977-5999) et RC1 (6166-6146) selon le système de référence de Cambridge.

2. RESULTATS

Le contenu moyen en ATP dans les 363 ovocytes mesurés était de $2,6 \pm 0,7$ pmol/ovocyte avec un Coefficient de Variation (CV) de 19,3 % à 31,8 % selon les vaches.

Les résultats obtenus par animal concernant la quantité moyenne d'ATP ovocyttaire avant et après maturation *in vitro* (VG et MII) sont présentés dans le tableau.

La quantité moyenne de copies d'ADNmt par ovocyte a été de $382\ 938 \pm 261\ 258$ (n = 290) avec une variation significative entre les animaux (variant de 311 607 à 536 878 copies/ovocyte ; p < 0,05). De plus, il existe une grande variation des quantités d'ADNmt entre ovocytes de la même vache (CV de 46,5% à 76,3%).

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

La consommation des réserves d'ATP pendant la maturation ovocyttaire a été supérieure à la production chez les vaches ayant une bonne production de blastocystes. Ceci suggère que le métabolisme pourrait être utilisé comme critère de sélection d'animaux pour la production d'embryons.

L'analyse de la quantité d'ATP/ovocyte révèle une faible variation intra-animal mais forte entre les animaux (voir les CV). Par contre, l'analyse de la quantité d'ADNmt ovocyttaire a révélé une variation très importante intra-animal.

En conclusion, la quantité d'ADNmt est similaire entre des vaches bonnes et mauvaises productrices d'embryons (par exemple VC5 et VC4) et ne semble donc pas relié à la capacité au développement embryonnaire, contrairement à ce qui a été observé chez l'homme (Reynier *et al.*, 2001).

Cummins, J. 1998. Rev Reprod 3: 172-182.

Reynier, P., *et al.* 2001. Mol Hum Reprod 2001; 7: 425-429.

Tamassia, M. *et al.*, 2001. 17th A.E.T.E., Lyon - France., p 174.

Van Blerkom, J. *et al.*, 1995. Hum Reprod 10: 415-424.

Réserves d'ATP et quantité de copies d'ADN mitochondrial dans les ovocytes. Animaux ordonnés selon leur taux de blastocyste *in vitro*

Animal	Réserves d'ATP VG		Réserves d'ATP MII		Quantité d'ADNmt		Taux de blastocyste à J8 §	
	pmol/ovocyte	(n)	pmol/ovocyte	(n)		(n)	%	(n)
VC 5	3,0 ^{bc} ± 0,6	(30)	2,4 ± 0,7	(23)	311 607 ^y ± 216 484	(41)	50,4 ^k %	(123)
VC 1	3,1 ^b ± 0,6	(42)	2,8 ± 0,4	(22)	391 171 ^{yz} ± 298 318	(48)	34,3 ^{kl} %	(207)
VC 2	2,7 ^c ± 0,7	(40)	2,5 ± 0,3	(33)	361 087 ^z ± 238 824	(64)	31,7 ^{lm} %	(350)
VC 3	2,1 ^{de} ± 0,5	(33)	1,8 ± 0,3	(27)	536 878 ^x ± 249 547	(36)	26,4 ^{mn} %	(121)
VC 6	3,1 ^a ± 0,3	(31)	3,8 ± 0,9	(24)	416 320 ^{yz} ± 311 246	(44)	19,3 ^{mn} %	(301)
VC 4	2,1 ^d ± 0,5	(28)	2,1 ± 0,3	(30)	328 853 ^y ± 207 829	(57)	12,4 ⁿ %	(233)
Moyenne/Total	2,7 ± 0,7	(204)	2,5 ± 0,8	(159)	382 938 ± 261 258	(290)	28,8 %	(1335)

Les chiffres (moyennes ± écart type) avec les mêmes exposants ne sont pas statistiquement différents (p > 0.05).

§ Référence Tamassia *et al.*, 2001