

Comparaison de la structure de la zone pellucide des ovocytes porcins et équins par microscopie électronique à transmission

Sylvie MUGNIER, Bernadette DELALEU, Patricia SOLNAIS, Cécile LAHUEC, Michèle MAGISTRINI, Ghylène GOUDET

INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France ; CNRS UMR6175, F-37380 Nouzilly, France ; Université de Tours, F-37041 Tours, France ; Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

goudet@tours.inra.fr

Comparison of the zona pellucida (ZP) of equine and porcine oocytes by transmission electron microscopy (TEM)

In porcine *in vitro* fertilization (IVF), the spermatozoa penetrate easily through the ZP of oocytes while in equine IVF, the spermatozoa attach to the ZP without ever penetrating. Thus, in these two species, the structure of the ZP was analysed by TEM and compared. No difference was observed between these species whatever the maturation stages of oocytes. Further scanning electron microscopy observations are planned to analyse the surface of ZP.

INTRODUCTION

Chez les mammifères, la fécondation, étape clé de la fertilité, se déroule en plusieurs étapes. Le spermatozoïde traverse tout d'abord les cellules du cumulus, qui sont des cellules nourricières autour de l'ovocyte. Puis il se fixe sur la zone pellucide, une enveloppe glycoprotéique entourant l'ovocyte, et la traverse (figure 1). Ensuite, il fusionne avec la membrane plasmique de l'ovocyte. La fécondation *in vitro* (FIV) est un outil permettant de mieux comprendre les mécanismes de la fécondation afin de maîtriser la fertilité. Dans l'espèce porcine, les taux de FIV sont très élevés (80 % à 90 %) (Abeydeera and Day, 1997), mais les taux de polyspermie sont aussi très importants (50 à 70 %) (Funahashi and Day, 1997), ce qui limite un développement embryonnaire optimal. A l'inverse, dans l'espèce équine, les taux de FIV sont très faibles (inférieurs à 30 %) (Palmer et al., 1991) et aucune technique de FIV n'est actuellement efficace et répétable. La différence semble se situer au niveau de la zone pellucide. En effet, dans l'espèce porcine, les spermatozoïdes traversent la zone pellucide en grand nombre, et cette enveloppe ne joue pas son rôle de barrière à la polyspermie. A l'inverse, dans l'espèce équine, les spermatozoïdes se fixent à la zone pellucide mais ne la traversent pas. L'étude comparée de la structure de la zone pellucide des ovocytes équins et porcins devrait permettre de mettre en évidence les éléments responsables de la pénétration des spermatozoïdes dans la zone pellucide. Notre objectif a donc été de comparer par microscopie électronique à transmission la structure interne de la zone pellucide des ovocytes équins et porcins, à différents stades de maturation : immatures, après maturation *in vivo* ou après maturation *in vitro*.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les ovocytes immatures ont été collectés sur des ovaires de truies abattues aux abattoirs de Vendôme et de Sablé sur Sarthe

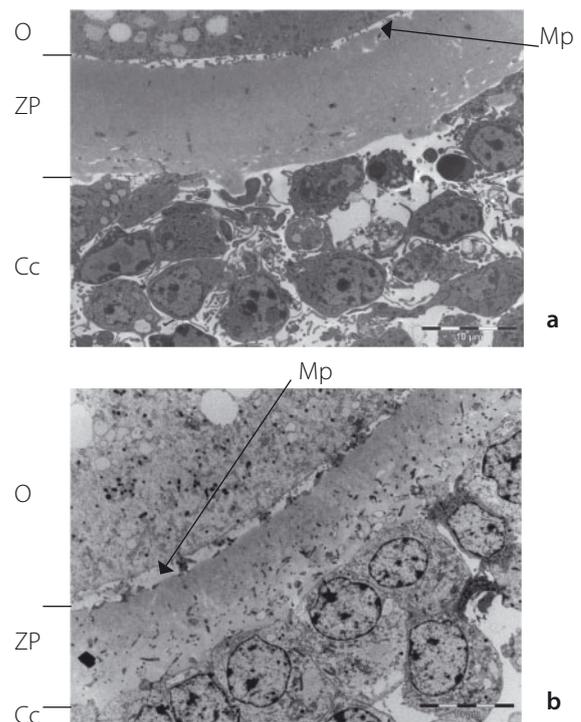


Figure 1 - Localisation de la zone pellucide des ovocytes immatures porcins (a), et équins (b), observés par microscopie électronique à transmission (grossissement 1950x). O : Ovocyte ; Mp : Membrane plasmique de l'ovocyte (indiqué par la flèche) ; ZP : Zone pellucide ; Cc : Cellules du cumulus

et sur des ovaires de juments abattues aux abattoirs d'Alençon, de Blois et de Lusignan. Les ovaires ont été transportés dans du sérum physiologique à 32-38°C, le liquide folliculaire des follicules visibles sur les ovaires a été aspiré à l'aide d'une aiguille reliée à une pompe. Les ovocytes immatures ont été recherchés dans le liquide collecté.

Une partie des ovocytes immatures porcins et équins a été cultivée *in vitro* dans un milieu de culture adapté à chaque espèce, afin d'obtenir des ovocytes matures.

Les ovocytes préovulatoires ont été collectés sur des ovaires de truies de notre troupeau expérimental abattues juste avant ovulation, et sur des juments de notre troupeau expérimental par ponction folliculaire transvaginale *in vivo* sous contrôle échographique.

Les ovocytes immatures, matures et préovulatoires équins et porcins ont été fixés, post-fixés puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol et enfin inclus dans une résine, l'épon. Des coupes d'ovocytes de 70 nm ont été réalisées avant observation au microscope électronique à transmission.

2. RÉSULTATS

Après observations des coupes au microscope électronique à transmission, dans l'espèce porcine, la zone pellucide des ovocytes immatures présente un réseau serré, tandis que celle des ovocytes matures montre un réseau plus lâche (figure 2). La zone pellucide des ovocytes préovulatoires possède la même structure que les ovocytes matures (figure 2).

Dans l'espèce équine, la zone pellucide des ovocytes immatures présente aussi un réseau serré et celle des ovocytes matures ou préovulatoires, un réseau plus lâche (figure 2).

Aucune différence n'a été observée entre les ovocytes équins et porcins aux différents stades de maturation, dans nos conditions expérimentales.

CONCLUSION

Aucune différence de la structure interne de la zone pellucide n'a pu être mise en évidence entre les espèces équine et porcine aux différents stades de maturation. La comparaison de la structure interne de la zone pellucide ne permet donc pas d'expliquer les différences de taux de pénétration entre ovocytes équins et porcins. Par contre, la structure de la zone pellucide est différente entre les ovocytes immatures et matures. En effet, le réseau de la zone pellucide des ovocytes équins ou porcins devient plus lâche au cours de la maturation, ce qui facilite pro-

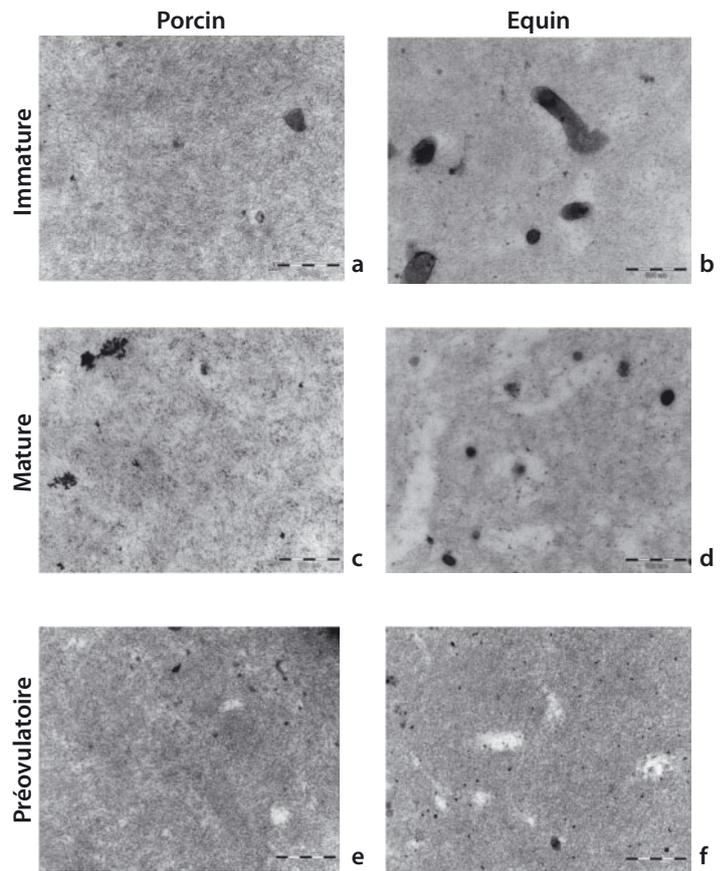


Figure 2 - Structure de la zone pellucide d'ovocytes porcins immature (a), mature (c) et préovulatoire (e) et d'ovocytes équins immature (b), mature (d), préovulatoire (f) observée par microscopie électronique à transmission (grossissement 34 000x)

bablement le passage des spermatozoïdes au travers de la zone pellucide lorsque les ovocytes sont matures.

Des travaux sont en cours pour compléter cette analyse par une observation en microscopie électronique à balayage.

REMERCIEMENTS

Ce projet a pu être réalisé grâce au financement des travaux par les Haras Nationaux et de la thèse de Sylvie Mugnier par les Haras Nationaux et la Région centre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeydeera L.R., Day B.N., 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Bio. Reprod.*, 57, 729-734.
- Funahashi H., Day B.N., 1997. Advances *in vitro* production of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 52, 271-283.
- Palmer E., Bézard J., Magistrini M., Duchamp G., 1991. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 44, 375-384.