2024. Journées Recherche Porcine, 56, 321-322.
Publication sous Licence Creative Commons

Impact de la méthode de ponction folliculaire sur la maturation *in vitro* des ovocytes porcins

Victoria SLEZEC-FRICK (1,2), Guillaume LENOIR (2), Loris COMMIN (1), Léa BRAVI (1), Harmonie LAMARQUE (2), Pierre BRUYERE (2), Thierry JOLY (3), Samuel BUFF (1).

(1) Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP ICE 2021.A104 & CRB CryAnim, 69280, Marcy l'Etoile, France
(2) Axiom, 37310, Azay-sur-Indre, France
(3) Université de Lyon, ISARA-Lyon, UPSP ICE 2021.A104, 69007, Lyon, France

victoria.slezec-frick@vetagro-sup.fr

Effect of the follicular puncture method on *in vitro* maturation of porcine oocytes

Protocols for *in vitro* maturation of porcine oocytes usually involve collecting ovaries from an abattoir, transporting them to a laboratory in a phosphate-buffered saline solution at a fixed temperature and finally puncturing them. The oocytes retrieved are then sorted and matured. This study aimed to confirm that the *in vitro* maturation rate could be improved by puncturing the follicles directly on site (*i.e.*, on the slaughter line) and then transporting their contents to the laboratory in a suitable medium at 37°C. To assess oocyte quality after maturation, we compared effects of abattoir puncture to those of laboratory puncture on the nuclear and cytoplasmic maturation rates of porcine oocytes after *in vitro* maturation. Oocytes were stained with Hoechst 33342 for the nuclear stage and FITC-PNA to assess cortical granule (GC) distribution and observed by confocal microscopy. The nuclear stages identified were the germinal vesicle, immature oocyte and mature oocyte. The oocytes were classified into three types according to the GC distribution pattern: immature, incomplete or fully mature. Follicular puncture performed at the abattoir and in the laboratory showed similar rates of nuclear maturation (90.7 ± 4.1 % and 84.7 ± 6.2 % respectively). However, the abattoir puncture showed a better cytoplasmic maturation rate than the laboratory puncture (45.3 ± 12.6 % *vs* 19.0 ± 14.6 %, $p \leq 0.01$). In addition, the abattoir puncture yielded higher-quality structures before maturation. It was also easier to maintain oocytes at 37°C than it was to maintain ovaries at room temperature.

INTRODUCTION

La maturation *in vitro* des ovocytes porcins nécessite de réaliser des ponctions folliculaires sur des ovaires de truies. Les protocoles de ponction présentés dans la littérature s'organisent en plusieurs étapes : collecte des ovaires en abattoir, transport des ovaires dans une solution de PBS (phosphate buffered saline) à température fixée (Lin *et al.*, 2011b) et ponction des follicules présents à la surface des ovaires. Les ovocytes collectés sont ensuite triés et mis en maturation (Lin *et al*, 2011a). L'objectif de cette étude était de comparer deux méthodes de ponction folliculaire : la méthode décrite dans la bibliographie et une méthode de ponction à l'abattoir. Cette dernière consiste à ponctionner les follicules directement à l'abattoir, puis à les transporter dans un milieu de collecte à 37°C jusqu'au laboratoire.

Le processus de maturation de l'ovocyte comprend les maturations nucléaire et cytoplasmique, l'achèvement de la maturation nucléaire ne reflétant pas nécessairement une maturation cytoplasmique normale. La maturation nucléaire de l'ovocyte est caractérisée par l'expulsion du premier globule polaire (métaphase II), tandis que la maturation cytoplasmique est reflétée, entre autres, par le schéma de distribution des granules corticaux (GCs) dans le cytoplasme de l'ovocyte.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Production des milieux

Tous les produits chimiques et réactifs, sauf indication contraire, ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Les milieux ont été préparés comme décrit précédemment (Abeydeera *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2017).

Le milieu de tri des ovocytes était composé de 114 mM de NaCl, 3,2 mM de KCl, 2 mM NaH_2PO_4, 0,4 mM de $NaHCO_3$, 0,5 mM de $CaCl_2.2H_2O$, 10 mM de Na-lactate, 0,5 mM de $MgCl_2.6H_2O$, 10 mM d'Hepes, 0,01 % (p/v) d'alcool polyvinylique (PVA), 12 mM de sorbitol, 0,25 mM de Na-pyruvate, 0,01 mg/mL de rouge de phénol et de 10 µg/mL de gentamicine.

Le milieu de maturation était composé de M199 (Pan Biotech, Aidenbach, Allemagne) supplémenté de 0,1 % de PVA, 908,8 µM de Na-lactate, 3,05 mM de D-glucose et 10 µg/mL de gentamicine, supplémenté de 10 mg/mL de facteur de croissance épidermique, 0,5 µg/mL d'hormone lutéinisante, 0,5 µg/mL d'hormone folliculo-stimulante, 0,57 mM de L-cysteine, 40 ng/mL de facteur de croissance des fibroblastes-2 (R&D Systems, MN, USA), 20 ng/mL de facteur inhibiteur de leucémie (R&D Systems) et de 20 ng/mL de facteur de croissance de l'insuline-1 (R&D Systems).

Le milieu de collecte des ovocytes était composé du milieu de maturation sans hormone.

1.2. Ponction folliculaire

Les ovaires ont été prélevés dans un abattoir commercial sur des cochettes destinées à la consommation humaine et n'ayant pas reçu de traitement spécifique.

1.2.1. *Ponction à l'abattoir*

Les follicules de 3-7 mm (Figure 1) présents à la surface des ovaires ont été aspirés à l'aide d'une aiguille 18 G et d'une seringue de 2 mL. Le contenu de la seringue a été déposé dans des tubes contenant du milieu de collecte et maintenus à 37°C.

1.2.2. *Ponction au laboratoire*

Les ovaires ont été transportés au laboratoire dans du PBS à température ambiante, puis ont été traités de façon identique.

1.3. Mise en maturation

Le contenu des tubes a été évalué dans du milieu de tri, afin de sélectionner les complexes cumulo-ovocytaires (COCs) de meilleure qualité (Q1 et Q2, Figure 1). Les COCs sélectionnés ont été placés par lots de 80 dans du milieu de maturation pendant 44 heures, à 38,5°C, dans de l'air humidifié et à 5 % de CO_2. Les COCs provenant de la ponction à l'abattoir et au laboratoire seront désignés par Aba et Lab, respectivement.

1.4. Marquage nucléaire et des granules corticaux

A la fin de la période de maturation, les COCs ont été décoronisés mécaniquement, puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 4 % pendant 20 min, à température ambiante. Les ovocytes ont ensuite été lavés dans une solution de PBS contenant 0,1 % de PVA. Puis les ovocytes ont été perméabilisés dans une solution de PBS contenant 0,1 % (v/v) de Triton 100× et 0,5 % de PVA. Les structures ont ensuite été marquées au FITC-PNA (1 mg/mL, 30 min). Enfin les ovocytes ont été marqués au Hoechst 33342 (10 mg/mL, 5 min). Après la coloration, les ovocytes ont été montés dans du Fluoromount-G™ Mounting Medium entre lame et lamelle.

1.5. Evaluation microscopique

Les lames ont été évaluées au microscope confocal à balayage laser (LSM 800, Zeiss, Allemagne). Les ovocytes ont été classés selon les groupes suivants (Lin *et al.*, 2016) : vésicule germinale (VG), immature, mature et dégénéré pour le stade nucléaire ; immature (type III), incomplètement mature (type II) et complètement mature (type I) pour la distribution des GCs.

1.6. Analyse statistique

Le logiciel GraphPad Prism (Boston, MA, USA) a été utilisé pour les analyses statistiques. Les expériences ont été répétées deux fois. Pour les comparaisons entre groupes, une analyse de contingence (test du Khi-deux) a été réalisée.

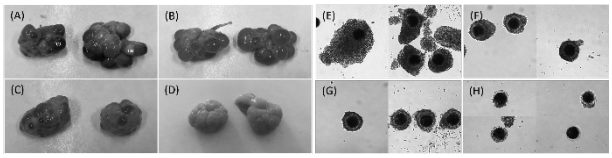

Figure 1 – Photos d'ovaires (A-D) et classement des grades des complexes cumulo-ovocytaires porcins (E-H)

(A) Ovaires présentant des corps jaunes (CJ) et des corps blanc (CB). (B) Ovaires présentant des follicules supérieurs à 8 mm de diamètre. (C) Ovaires présentant des follicules compris entre 3 et 7 mm de diamètre. (D) Ovaires présentant des follicules inférieurs à 3 mm de diamètre. (E) Q1, cinq couches ou plus de cellules du cumulus. (F) Q2, trois à quatre couches de cellules du cumulus. (G) Q3, une ou deux couches de cellules du cumulus. (H) Q4, cellules du cumulus partielles ou ovocytes dénudés.

2. RESULTATS

La qualité ovocytaire, lors du tri, dans le lot Lab était globalement inférieure à celle dans le lot Aba, avec la présence de Q2 et Q3 majoritairement, contre la présence de Q1, Q2 et Q3 pour le lot Aba. De plus, lors du tri ovocytaire, le lot Lab comportait un plus grand nombre de cellules ovariennes en suspension que dans le lot Aba, rendant la sélection des COCs plus difficile.

Tableau 1 – Maturation nucléaire des ovocytes ponctionnés à l'abattoir (Aba) et au laboratoire (Lab).

Lot	n	VG, %	Immature, %	Mature, %	Dégénéré, %
Aba	161	0,0 ± 0,0	8,1 ± 4,2	90,7 ± 4,1	1,2 ± 0,0
Lab	163	1,8 ± 2,6	9,8 ± 3,6	84,7 ± 6,2	3,7 ± 0,0

VG : vésicule germinale, Aucune différence significative (0,5 ≤ p ≤ 0,9).

Les résultats de maturation nucléaire n'ont pas montré de différence significative entre les deux lots (Tableau 1). Tandis que la maturation cytoplasmique a montré une différence significative avec 45,3 ± 12,6% d'ovocytes complètement matures contre 19,0 ± 14,6%, respectivement pour le lot Aba et le lot Lab (Tableau 2).

Tableau 2 – Maturation cytoplasmique des ovocytes ponctionnés à l'abattoir (Aba) et au laboratoire (Lab).

Lot	n	Type III, %	Type II, %	Type I, %
Aba	161	16,1 ± 1,3**	38,5 ± 11,3	45,3 ± 12,6**
Lab	163	33,7 ± 18,5*	47,2 ± 3,9	19,0 ± 14,6*

Des exposants différents dans une même colonne indiquent une différence significative (p ≤ 0,01).

CONCLUSION

La ponction des follicules à l'abattoir permet donc d'obtenir de meilleurs taux de maturation cytoplasmique que la ponction au laboratoire. Il est également plus facile de maintenir les ovocytes à 37°C que de maintenir les ovaires à une température spécifique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeydeera L.R., Wang W., Prather R.S., Day B.N., 1998. Maturation in Vitro of Pig Oocytes in Protein-Free Culture Media: Fertilization and Subsequent Embryo Development in Vitro. *Biol. Reprod.*, 58, 1316-1320.
- Lin T., Oqani R.K., Lee J.E., Shin H.Y., Jin D.I., 2016. Coculture with good-quality COCs enhances the maturation and development rates of poor-quality COCs. *Theriogenology*, 85, 396-407.
- Lin Y.-A., Tsai H.-B., Liao M.-H., Chen M.-C., 2011a. Effect of Preserving Condition of Porcine Ovaries on the Development of In Vitro Matured Oocytes: Effect of Preserving Condition of Porcine Ovaries. *Reprod. Domest. Anim.*, 46, 333-337.
- Lin Y.-A., Tsai H.-B., Liao M.-H., Chen M.-C., 2011b. Effects of preservation media on in vitro maturation of porcine oocytes. *Chin. J. Physiol.*, 54, 1-6.
- Yuan Y. et al, 2017. Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114, E5796-E5804.