

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

Victoria SLEZEC-FRICK (1,2), Guillaume LENOIR (2), Loris COMMINS (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 ($90.7 \pm 4.1\%$ and $84.7 \pm 6.2\%$ respectively). However, the abattoir puncture showed a better cytoplasmic maturation rate than the laboratory puncture ($45.3 \pm 12.6\%$ vs $19.0 \pm 14.6\%$, $p \leq 0.01$). 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 de NaH_2PO_4 , 0,4 mM de NaHCO_3 , 0,5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM de Na-lactate, 0,5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 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-cystéine, 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.