

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

V. Slezec-Frick^{1,2}, G. Lenoir², L. Commin¹, L. Bravi¹, H. Lamarque², P. Bruyère¹, T. Joly³, S. Buff¹

¹Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP ICE 2021.A104, 69280, Marcy-l'Etoile, France.

²Axiom Genetics, 37310, Azay-sur-Indre, France.

³Université de Lyon, ISARA-Lyon, UPSP ICE 2021.A104, 69007, Lyon, France.

Introduction

Dans les protocoles de maturation ovocytaire porcine *in vitro*, les ovaires sont généralement collectés à l'abattoir, transportés au laboratoire dans une solution de PBS à température fixe et enfin ponctionnés. Les ovocytes récupérés sont ensuite triés et maturés^(1,2) (lot **Lab** dans notre étude). Notre objectif est ici de confirmer qu'il est possible d'obtenir de meilleurs taux de maturation *in vitro* en ponctionnant les follicules directement sur place, c'est-à-dire sur la chaîne d'abattage, puis en transportant le contenu de ces follicules au laboratoire dans un milieu adapté à 37 °C (lot **Aba**, figure 1).

Pour évaluer la qualité des ovocytes après maturation, nous avons comparé l'effet de la ponction en abattoir et en laboratoire sur les taux de maturations nucléaire et cytoplasmique des ovocytes porcins après maturation *in vitro*. Les stades nucléaires identifiés ont été : **vésicule germinale (VG)**, **ovocyte immature** et **ovocyte mature**. La maturation cytoplasmique a été classée en trois types : **immatures (type III)**, **incomplètement matures (type II)** et **pleinement matures (type I)**.

Procédure

Les ovaires ont été prélevés dans un abattoir local, sur des cochettes tout juste pubères. Les follicules de tailles moyennes (3-7 mm) présents à la surface des ovaires (figure 2) ont été ponctionnés à l'aide d'une aiguille 18 G et d'une seringue de 2 mL, puis le contenu de cette seringue a été déposé dans des tubes contenant du milieu de collecte et maintenus à 37°C.

Les complexes cumulo-ovocytaires (Q1 et Q2, figure 3) ont été mis en maturation *in vitro* pendant 44 heures à l'incubateur (38.5°C, 5% CO₂, 100% d'humidité)^(3,4).

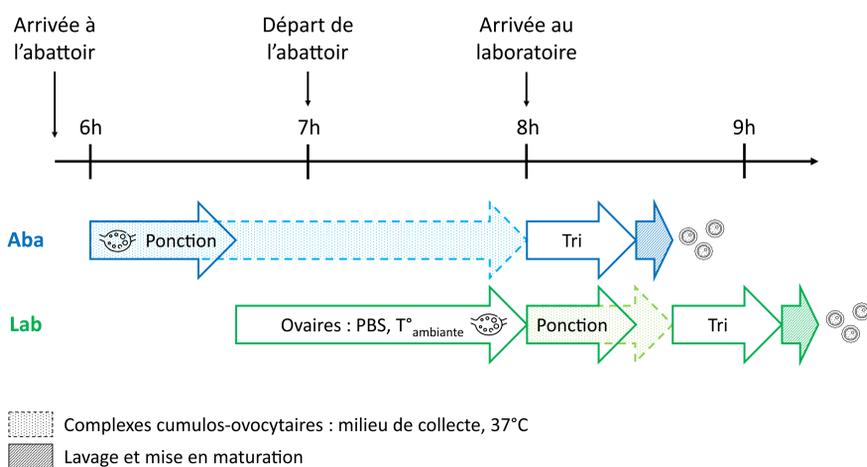


Figure 1. Plan d'expérience pour la mise en place des protocoles de ponctions à l'abattoir (Aba) et au laboratoire (Lab). PBS : Phosphate Buffered Solution.

Les complexes cumulo-ovocytaires ont été marqués au Hoechst 33342 pour définir le stade nucléaire et au FITC-PNA pour définir le stade de maturation cytoplasmique. Un microscope confocal à balayage laser (LSM 800, Zeiss) a permis d'évaluer ces complexes (tableau 1).

Critères de sélection

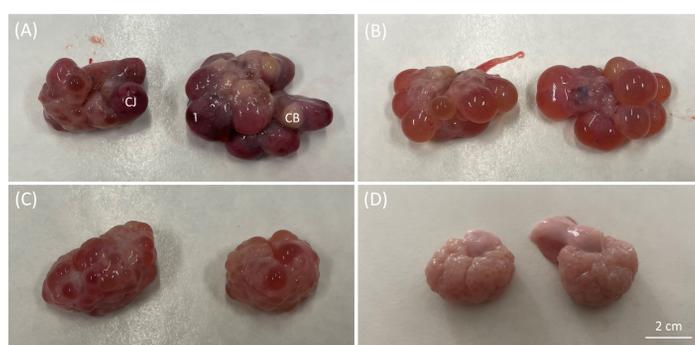


Figure 2. Photo d'ovaires. (A) Ovaires présentant des corps jaunes (CJ) et des corps blanc (CB). (B) Ovaires présentant des follicules supérieurs 8 mm de diamètre. (C) Ovaires présentant des follicules compris entre 3 et 7 mm de diamètre. (D) Ovaires présentant des follicules inférieurs à 3 mm de diamètre.

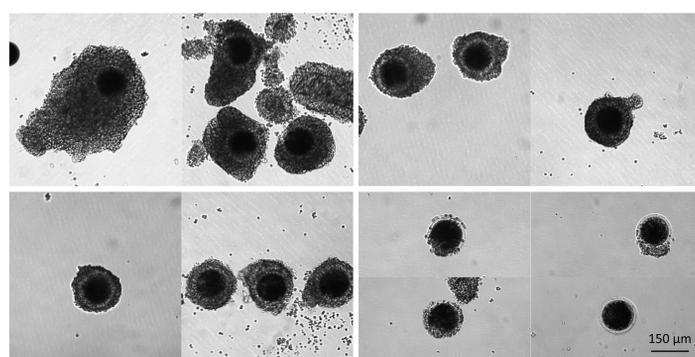


Figure 3. Classement des grades des complexes cumulo-ovocytaires porcins. (A) Q1, cinq couches ou plus de cellules du cumulus. (B) Q2, trois à quatre couches de cellules du cumulus. (C) Q3, une ou deux couches de cellules du cumulus. (D) Q4, cellules du cumulus partielles ou ovocytes dénudés. Photos réalisées au JuLiBr™.

Résultats

Tableau 1. Maturation nucléaire (A) et cytoplasmique (B) des ovocytes porcins, ponctionnés à l'abattoir (Aba) ou au laboratoire (Lab).

A)	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
B)	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 ($p \leq 0.01$; test du Khi-deux).

Conclusion

La ponction à l'abattoir permet d'obtenir de **meilleurs taux de maturation cytoplasmique** que la ponction au laboratoire.

Cette méthode a également permis de constater que, lors du tri ovocytaire, le lot **Lab** comportait un plus grand nombre de cellules ovariennes en suspension que le lot **Aba**, rendant la **sélection des complexes cumulo-ovocytaires plus difficile**.

De plus, il est **plus facile de maintenir des ovocytes à 37°C** que de maintenir des ovaires à une température fixe, de par leur taille bien plus volumineuse.

La **maturation cytoplasmique** permet la mise en place de la barrière polyspermiq ue chez les mammifères. Ainsi, améliorer les taux de maturation cytoplasmique pourrait permettre de **limiter le phénomène de polyspermie *in vitro* récurrent chez le porc** ⁽⁵⁾.

(1) Lin et al., Reprod. Domest. Anim., 46 (2011) 333-337.

(2) Lin et al., Chin. J. Physiol., 54 (2011) 423-433.

(3) Abeydeera et al., Biol. Reprod., 58 (1998) 1316-1320.

(4) Yuan et al., Proc. Natl. Aca. Sci., 144 (2017) E5796-E5804.

(5) Chen et al., Cells, 10 (2021) 2770.