

20ème Journée d'Etude



2 Mars 1994

Qualité des ovocytes et des follicules après superovulation ou au cours de cycles naturels

Ovocyte and follicle quality after superovulation or during natural cycle

Ghylene Goudet, Jacqueline
Bézar, G. Duchamp, Christine
Gaillot, B. Bruneau et E. Palmer

PRMD, Unité de Reproduction Equine, Haras Nationaux-INRA, 37380 Nouzilly, FRANCE

Résumé

Un traitement de superovulation a été réalisé chez des ponettes par injections quotidiennes d'extraits d'hypophyses équinés enrichis en FSH. Le liquide folliculaire et l'ovocyte sont récoltés juste avant l'ovulation induite. La maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte est étudiée. Les principales hormones stéroïdes sont dosées dans les liquides folliculaires.

Le traitement de superovulation augmente le nombre de follicules préovulatoires par cycle. Il n'influence pas significativement la maturation nucléaire ou cytoplasmique de l'ovocyte. Toutefois, il modifie les synthèses de stéroïdes. Or, une altération de la composition du liquide folliculaire influe sur la maturation de l'ovocyte. Il est donc probable que le traitement ait un effet sur la qualité de l'ovocyte.

Mots-clés : Ovocyte, maturation, superovulation, jument.

Summary

Pony mares were assigned to a superovulation treatment that consist in daily injections of equine pituitary FSH-enriched extract. The follicular fluid and the oocyte were collected just before induced ovulation. Oocyte nuclear and cytoplasmic maturation is analysed. The main steroid hormones were dosed in the follicular fluids.

The superovulation treatment increase the preovulatory follicles number by cycle. It does not significantly influence the oocyte nuclear and cytoplasmic maturation. However, it impaired the steroids synthesis. A change in the follicular fluid composition has an influence on the oocyte maturation. The treatment has probably an effect on the oocyte quality.

Key-words : Oocyte, maturation, superovulation, mare.

INTRODUCTION

L'objectif actuel de l'élevage équin est l'amélioration génétique. Dans ce cadre, les techniques de fécondation in vitro (Bézar et al, 1992) et de transfert d'embryons (Lagneaux et al, 1988) permettront d'optimiser l'utilisation des meilleures juments. Les mises au point expérimentales, comme l'augmentation du nombre d'embryons produit, nécessite un grand nombre d'ovocytes.

Pour cela des traitements de superovulation sont en cours d'étude. La croissance des follicules dépend des taux circulants de gonadotrophines. Lorsqu'un follicule atteint 20mm de diamètre, il devient dominant et provoque une baisse des taux de FSH dans le sang, ce qui bloque la croissance des autres follicules. Un apport exogène de gonadotrophines maintient cette croissance.

En effet, une stimulation de l'ovaire permet la croissance de plusieurs follicules et conduit à plusieurs ovulations simultanées : 3 ovulations par cycle traité contre 1 par cycle témoin (Palmer et Hajmeli, 1992). Par contre, le nombre d'embryons reste inchangé : 0,6 embryon par cycle traité ou témoin.

L'objectif de ce travail est de comprendre pourquoi le traitement de superovulation n'améliore pas la productivité des animaux. Pour cela, nous avons vérifié l'hypothèse d'une mauvaise qualité des ovocytes qui seraient inaptes à la fécondation.

Matériels et méthodes

Trois étapes sont nécessaires : obtenir des follicules à la suite d'un traitement de superovulation, récolter et étudier les ovocytes et analyser les liquides folliculaires.

Dix-huit ponettes de type Welsh ont été utilisées. Douze animaux ont subi 4 cycles avec alternance de cycles témoins et de cycles traités en superovulation. Six animaux ont été utilisés au cours d'un seul cycle témoin.

Les cycles témoins débutent par une ponction transvaginale sous échographie de tous les follicules de plus de 12mm de diamètre. Ceci évite de confondre les follicules du cycle précédent avec les follicules en croissance. Le même jour, une injection d'un analogue de Prostaglandines F-2x induit la lutéolyse, c'est-à-dire la destruction des corps jaunes de la phase lutéale précédente. Cette injection est réalisée 7 jours post-ovulation ou post-ponction, car le corps jaune est réfractaire jusqu'à 5 jours. Les follicules entrent alors dans une phase de croissance suivie par échographie rectale.

Lorsque le follicule préovulatoire atteint 35 mm de diamètre l'ovulation est induite par injection d'un extrait hypophysaire brut ou CEG (Crude Equine Gonadotrophin ; Duchamp et al,

1987). L'ovulation devrait avoir lieu en moyenne 35 heures après. Une ponction transvaginale sous échographie de tous les follicules de plus de 25 mm de diamètre réalisée 34 heures après induction permet de collecter ovocytes et liquides folliculaires à un stade proche du stade ovulatoire. Un nouveau cycle démarre 7 jours après ponction.

Au cours des cycles traités, les animaux sont suivis de la même manière. Le traitement consiste en injections intra-musculaires quotidiennes d'un extrait hypophysaire équin enrichi en FSH (Follicle Stimulating Hormone), obtenu par purification de CEG (Hofferer et al, 1991 ; 1992).

Pour chaque animal, deux durées de traitement ont été testées.

Le traitement long débute 2 jours après l'injection de prostaglandines et se termine le jour de l'induction d'ovulation. Il a duré en moyenne 7,6 jours.

Le traitement court débute lorsque le plus gros follicule atteint 18mm, quand il devient dominant, et se termine lorsqu'un deuxième follicule atteint 25 mm, quand sa croissance est indépendante des taux de FSH. Il a duré en moyenne 4,2 jours.

L'induction d'ovulation est réalisée quand le follicule préovulatoire atteint 35 mm de diamètre, ou, en présence de plusieurs follicules de grande taille, quand le deuxième atteint 30 mm. La ponction a lieu 34 heures plus tard.

La ponction folliculaire transvaginale sous échographie a pour but d'aspirer le liquide contenu dans un follicule déterminé et son ovocyte.

Cette intervention est réalisée sous contrôle échographique assuré par une sonde allongée introduite dans le vagin. L'aiguille utilisée pour la ponction est guidée parallèlement à la sonde. Avec une main dans le rectum, l'opérateur positionne l'ovaire de façon à placer le follicule à ponctionner devant l'aiguille. Cette technique permet de choisir le follicule ponctionné, contrairement à la ponction par le flanc (Palmer et al., 1991).

Les ovocytes sont recherchés sous loupe binoculaire dans le liquide folliculaire et les liquides de rinçage, puis préparés pour une étude histologique.

Deux critères de qualité sont étudiés :

- la maturation nucléaire, par observation en microscopie optique de coupes semi-7 fines (1 μ m d'épaisseur environ), afin de déterminer le stade du noyau,
- la maturation cytoplasmique, par observation en microscopie électronique de coupes ultra-fines (60 nm d'épaisseur environ), afin d'analyser la localisation des granules corticaux.

L'étude de la maturation nucléaire a conduit à la définition de cinq catégories :

- les ovocytes non récupérés à la ponction,
- les ovocytes perdus en cours d'analyse,
- les ovocytes en métaphase II, stade normalement atteint par les ovocytes à l'ovulation (King et al, 1987),
- les ovocytes immatures, c'est-à-dire n'ayant pas atteint le stade métaphase II,
- les ovocytes dégénérés (lésions des enveloppes, lyse des organites du cytoplasme).

Le seul critère de maturation cytoplasmique clairement défini chez les mammifères domestiques est la localisation des granules corticaux (GC). Lors de la fécondation, l'expulsion de ces organites semble empêcher la polyspermie. Les GC se situent donc à proximité de la membrane de l'ooplasmie à l'ovulation (Szollösi, 1991). Nous avons défini trois catégories :

- majorité des GC au centre du cytoplasme,
- GC répartis de manière homogène dans le cytoplasme,
- majorité des GC contre la membrane de l'ovocyte.

Nous avons considéré que les deux dernières catégories avaient une maturation cytoplasmique correcte.

Les liquides folliculaires obtenus à la ponction sont centrifugés et conservés à -20°C. En fin d'expérimentation, est réalisé un dosage radio-immunologique des principaux stéroïdes : progestérone (P4), testostérone (T), androstènedione (A), et oestradiol 17 β (E2).

Résultats et discussion

Nous avons étudié l'effet du traitement de superovulation sur la population folliculaire, sur l'état des ovocytes et sur le contenu du liquide folliculaire.

Le tableau 1 présente les résultats du traitement en nombre de follicules.

Douze cycles traités sur 17 ont donné plusieurs follicules à ponctionner, contre 2 sur 22 pour les cycles témoins. Donc la superovulation augmente de manière significative le nombre de follicules préovulatoires. Toutefois, 5 cycles traités n'ont pas répondu au traitement.

La durée du traitement n'influence pas de manière significative le nombre de follicules préovulatoires.

Soulignons que les effectifs limités posent problème pour l'analyse statistique. Les tendances observées auraient pu apparaître sous forme de différences significatives, si nous avons travaillé sur un plus grand nombre d'échantillons.

Les follicules issus de cycles témoins et donnant des ovocytes aptes à être fécondés (noyau en métaphase II et maturation cytoplasmique correcte) sont appelés la population de référence.

La figure I présente la distribution des concentrations en progestérone et testostérone sur une échelle logarithmique pour la population de référence et la population de follicules dont l'ovocyte n'a pas été retrouvé.

Ces derniers apparaissent en deux groupes : ceux dont les concentrations en progestérone sont semblables aux concentrations de la population de référence, et ceux dont les concentrations sont inférieures. Il en est de même pour les concentrations en oestradiol.

D'autre part, ces follicules sont significativement plus pauvres en oestradiol et androgènes (A et T).

Figure I Concentrations en stéroïdes dans les liquides folliculaires de la population de référence (a) et des follicules dont l'ovocyte n'a pas été récupéré (b). *Steroids concentrations in follicular fluid of the reference population (a) and the follicles whose oocyte has not been found (b).*

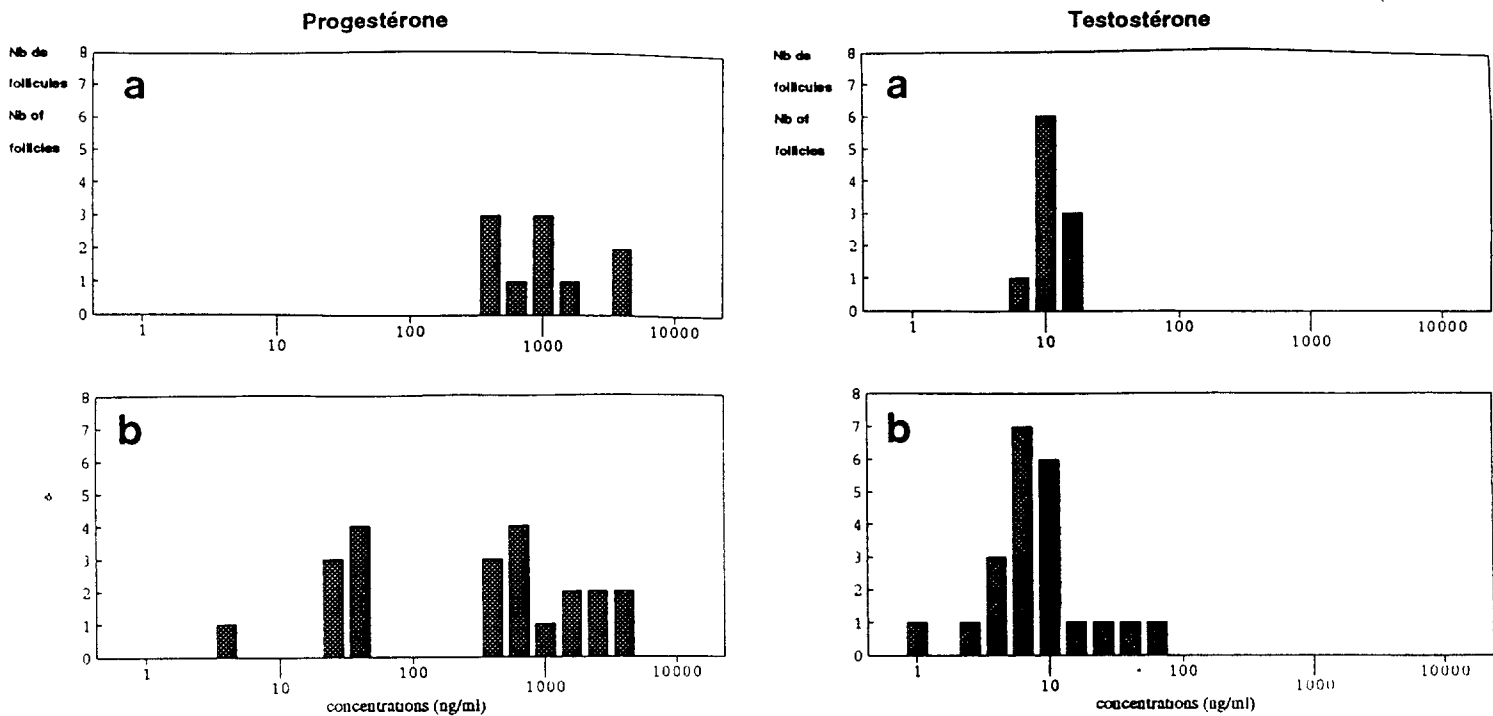
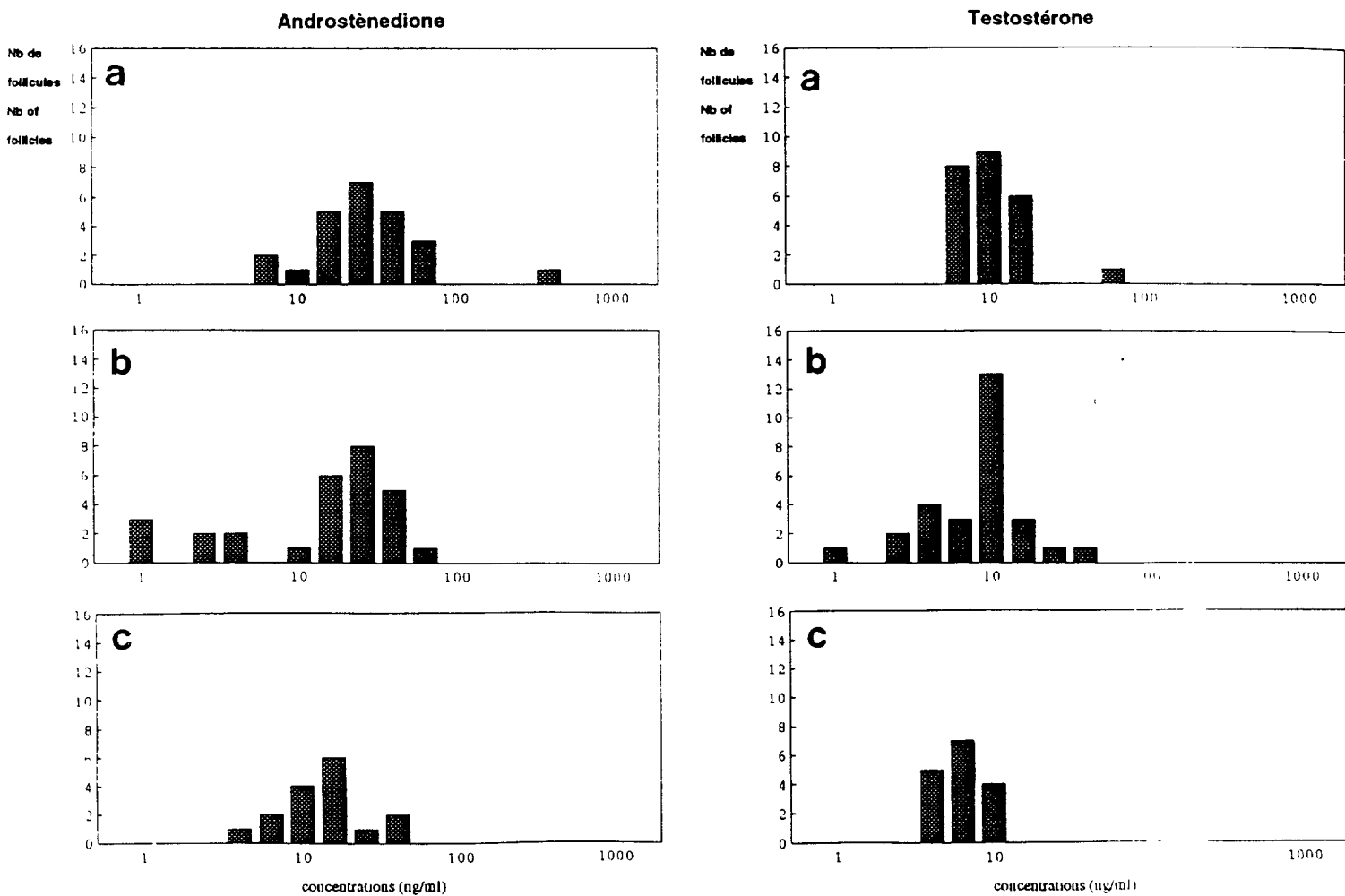


Figure II Concentrations en stéroïdes dans les liquides folliculaires en fonction du traitement : témoins (a), traitement court (b), traitement long (c). *Steroids concentrations in follicular fluid depending on the treatment : control (a), short treatment (b), long treatment (c).*



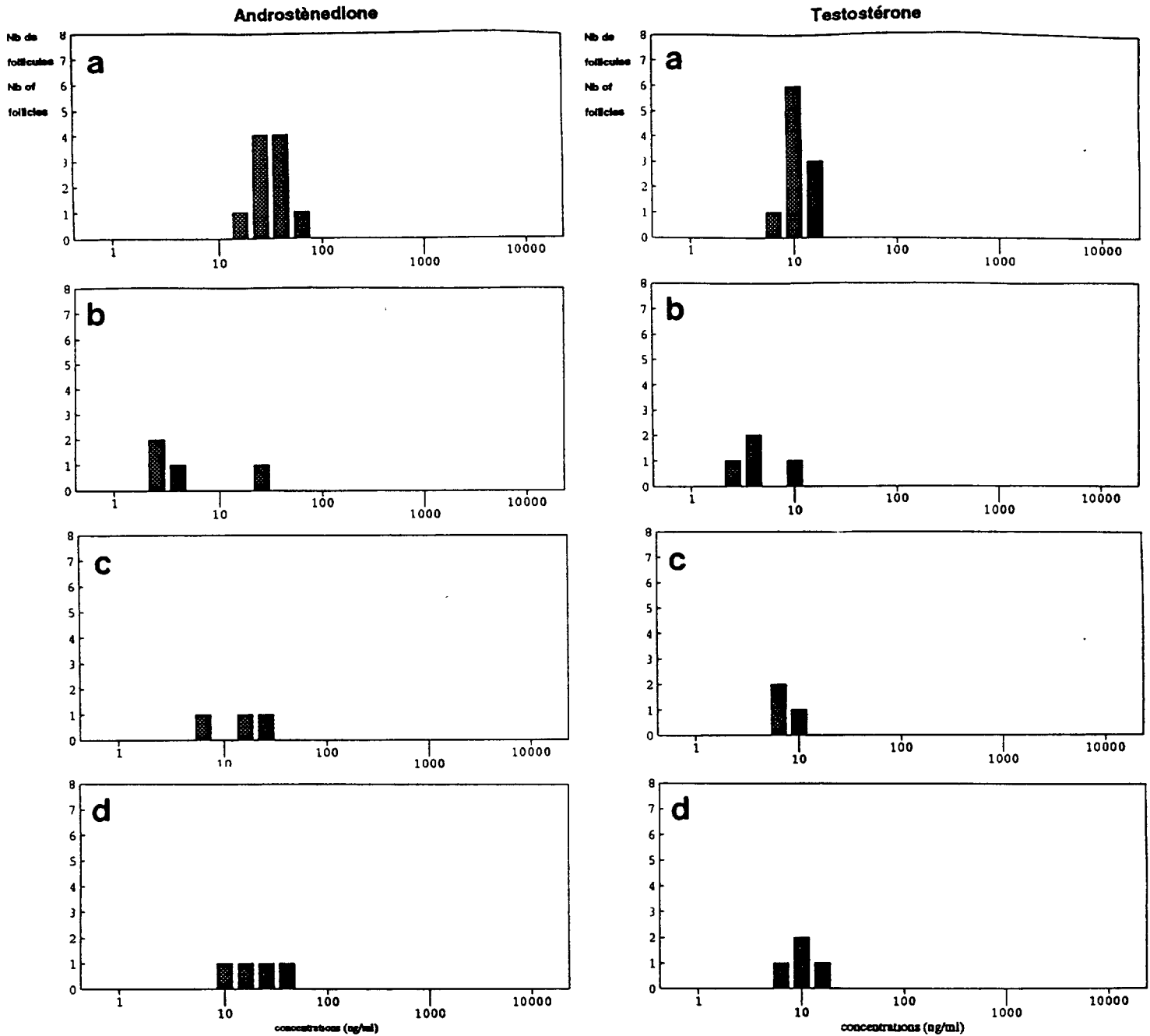


Tableau 1
Résultats du traitement de superovulation
Table 1
Results of the superovulation treatment

Traitement Treatment	Témoin Control	Traité Treated	Traitement court Short treatment	Traitement long Long treatment
nb de cycles avec un follicule > 25mm nb of cycles with one follicle > 25mm	20	5	2	3
nb de cycles avec plusieurs follicules > 25mm nb of cycles with several follicles > 25mm	2	12	8	4

Tableau 2 Effet du traitement sur la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte (nombre d'ovocytes et pourcentage) Table 2 Effect of the treatment on oocyte nuclear and cytoplasmic maturation (oocytes number and percentage).

Traitement Treatment	Témoin Control	Traité Treated	Traitement court Short treatment	Traitement long Long treatment
métaphase II metaphase II	14 (87,5%)	21 (81%)	13 (72%)	8 (100%)
dégénérés degenerated	2 (12,5%)	1 (4%)	1 (6%)	0
immatures immatures	0	4 (15%)	4 (22%)	0
GC proches de la membrane CG near the membrane	13 (93%)	20 (80%)	12 (71%)	8 (100%)
GC dans la zone interne CG in the central area	1 (7%)	5 (20%)	5 (29%)	0

Donc le faible taux de récupération (66%) s'explique en partie par une différence au niveau du follicule et par conséquent au niveau de l'ovocyte. Les ovocytes récupérés sont donc un échantillon biaisé. Toutefois, le pourcentage de récupération n'est pas significativement différent entre témoins et traités, ni entre traitement long et traitement court.

Le tableau 2 présente les effectifs d'ovocytes en fonction du stade de maturation nucléaire ou cytoplasmique pour les différents cycles.

Aucune différence significative de maturation nucléaire entre les cycles témoins et traités n'a pu être mise en évidence, même si le traitement a tendance à augmenter le pourcentage d'ovocytes immatures.

De même, on ne note aucune différence significative de maturation cytoplasmique entre traités et témoins, mais le traitement a tendance à donner plus d'ovocytes, avec une majorité de granules corticaux dans la zone interne de l'ooplasm.

La durée du traitement ne modifie pas de manière significative la maturation nucléaire et cytoplasmique. Toutefois, le traitement court a tendance à augmenter le pourcentage d'ovocytes immatures.

La figure II présente la distribution des concentrations en androgène sur une échelle logarithmique pour les follicules issus des cycles témoins et traités.

Les concentrations en androgène sont significativement plus faibles dans les follicules traités par rapport aux follicules témoins. Il en est de même pour les concentrations en E2.

Le traitement de superovulation semble donc avoir un effet sur les concentrations en stéroïdes dans le liquide folliculaire.

La durée du traitement n'a pas d'effet sur ces mêmes concentrations.

La figure III présente la distribution des concentrations en androgène pour la population de référence, les follicules qui ont donné un ovocyte immature, un ovocyte dégénéré, ou un ovocyte avec une majorité de granules corticaux dans la zone interne.

Les ovocytes immatures du point de vue nucléaire ou cytoplasmique, et les ovocytes dégénérés sont significativement plus pauvres en androgènes que la population de référence.

Il est donc possible d'établir un lien entre la maturation des ovocytes et les concentrations en stéroïdes dans le liquide folliculaire.

Ainsi le traitement de superovulation augmente le pourcentage de follicules pauvres en androgènes. Ces follicules sont en général associés à des ovocytes immatures ou dégénérés.

Il est donc probable que le traitement de superovulation altère la qualité des ovocytes.

CONCLUSION

Les résultats de superovulation obtenus précédemment (augmentation du nombre d'ovulations, mais pas du nombre d'embryons) peuvent être en partie expliqués par la qualité des ovocytes.

Mais le critère idéal de qualité des ovocytes reste la capacité à produire un embryon. La technique de ponction utilisée permet la mise en place de protocoles susceptibles de nous aider à mieux comprendre les mécanismes en jeu :

- ponction d'un faible volume de liquide folliculaire dans un follicule qu'on laisse ovuler, les résultats de l'analyse du liquide folliculaire sont mis en relation avec la présence ou non d'un embryon ;
- ponctions successives d'un follicule afin de connaître la dynamique des taux hormonaux du liquide folliculaire ...

Les nouvelles techniques mises au point et les particularités physiologiques spécifiques de la jument (taille importante du follicule préovulatoire) permettent une étude originale et riche d'informations, tant pour l'espèce équine que pour les autres espèces.

Références bibliographiques

BEZARD J., MAGISTRINI M., BATTUT I., DUCHAMP G., PALMER E. (1992). La fécondation in vitro chez les Equidés, *Rec. Méd. Vét.* 168 (11/12), 993-1003..

DUCHAMP G., BOUR B., COMBARNOUS Y., PALMER E. (1987). Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fert., suppl.* 35, 221-228.

HOFFERER S., DUCHAMP G., PALMER E. (1991). Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotrophins. *J. Reprod. Fert., suppl.* 44, 341349.

HOFFERER S., LECOMPTE F., MAGALLON T., PALMER E., COMBARNOUS Y. (1993). Induction of ovulation and superovulation in the mare using equine luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone separated by hydrophobic interaction chromatography. *J. Reprod. Fert.* 98, 597-602.

KING W. A., BEZARD J., BOUSQUET D., PALMER E., BETTERIDGE K. J. (1987). The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares. *Genome* 29, 679-682.

LAGNEAU D., DUCHAMP G., PALMER E. (1988). La transplantation embryonnaire chez la jument. 14eme Journée d'Etude CEREOPA, 163-181.

PALMER E., DRIANCOURT M.A. (1980). Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Therio.* 13, 203-216.

PALMER E., BEZARD J., MAGISTRINI M., DUCHAMP G. (1991). In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fert., suppl.* 44, 375-384.

PALMER E., HAJMELI G. (1992). Essais de superovulation chez la jument. *Rec. Med. Vet.* 168 (1112), 897-905.

SZOLLOSI D. (1991). Maturation de l'ovocyte. In: C THIBAUT et M.C. LEVASSEUR, *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*, pp 299-314. INRA, Ellipses, Edition Marketing PARIS .