

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Table des matières	9
Table des illustrations	12
Liste des abréviations.....	14
1 Introduction	15
2 Introduction au sujet et présentation de la question.....	19
2.1 Avantages et intérêts du transfert d'embryons cryopréservés	21
2.2 Historique et données chiffrées.....	21
2.3 Principe et techniques de cryopreservation	22
2.3.1 Principe	22
2.3.2 Protocoles.....	25
2.4 Les limites de la congélation des embryons équins	26
2.5 Les points de recherche actuels sur la cryoconservation des embryons équins	27
2.5.1 En amont de la congélation.....	27
2.5.2 Congélation et décongélation au sens strict.....	27
2.6 Présentation de l'étude expérimentale.....	31
3 Matériel et méthode	33
3.1 Gestion des animaux	35
3.1.1 Les ponettes donneuses et receveuses	35
3.1.2 Maîtrise artificielle des cycles.....	35
3.1.3 Les échographies	36
3.1.4 Calendrier des interventions	36
3.1.5 Les inséminations	36
3.2 Collecte des embryons.....	37
3.2.1 Age des embryons collectés	37
3.2.2 Matériel.....	37
3.2.3 Méthode	38
3.2.4 Préparation de l'embryon : recherche et lavage.....	38
3.3 La congélation.....	39
3.3.1 Groupes expérimentaux et incorporation du cryoprotecteur	39

3.3.2 Montage de l'embryon dans une paillette.....	39
3.3.3 Le processus de congélation stricte	40
3.3.4 Répartition des paillettes dans le canister d'azote liquide	41
3.4 Le transfert dans les receveuses	41
3.4.1 Décongélation	41
3.4.2 Transfert chirurgical	41
3.5 Suivi du transfert embryonnaire.....	42
3.5.1 Diagnostic de gestation.....	42
3.5.2 Collecte embryonnaire.....	42
3.5.3 Test de filiation	43
3.5.4 Evaluation des embryons.....	43
3.6 Analyse des résultats	46
4 Résultats	47
4.1 Bilan de la collecte des donneuses	49
4.2 Perte et élimination des embryons au cours de l'étude	49
4.3 Etude des variations du volume externe	50
4.4 Etude des variations du volume interne.....	52
4.5 Etude de l'évolution des notes morphologiques	53
4.6 Etude des taux de gestation.....	55
4.7 Taux de gestation comparés entre les lots témoin et direct	57
4.8 Corrélation de la note morphologique à la décongélation et de la viabilité in vivo (diagnostic de gestation positif à J11)	58
5 Discussion.....	59
5.1 Collecte des embryons.....	61
5.2 Le choix du transfert chirurgical	62
5.2.1 Choix d'un transfert chirurgical sur les ponettes	62
5.2.2 Choix d'un transfert multiple	62
5.3 Le diagnostic de gestation à J11 : une évaluation in vivo de la cryopreservation des embryons.....	63
5.4 Le volume : un indicateur des flux de cryoprotecteurs	65
5.5 Score morphologique : une bonne évaluation de la viabilité in vivo ?	67
5.6 Méthode d'ajout du cryoprotecteur	67
5.6.1 Intérêt de l'ajout direct du cryoprotecteur	67

5.6.2	Temps de contact avec le cryoprotecteur : un paramètre à définir.....	68
5.6.3	Utilisation d'adjuvants au cryoprotecteur.....	69
6	Conclusion.....	71
	Bibliographie	77
	Annexes.....	89
	Annexe 1 : Préparation des milieux	91
	Préparation des milieux de congélation (incorporation de cryoprotecteur)	91
	Préparation des milieux de décongélation (retrait du cryoprotecteur)	93
	Annexe 2 : Revue des méthodes d'évaluation de l'embryon.	96

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: variations physicochimiques des cellules au cours de la congélation (d'après Fahy, 1995).....	26
Figure 2 : matériel de collecte embryonnaire cervicale	37
Figure 3 : schéma et photographie du filtrage du liquide de collecte embryonnaire	38
Figure 4: organisation d'une paillette de congélation après montage de l'embryon	40
Figure 5: courbe de refroidissement en congélation lente.....	40
Figure 6: diamètres à évaluer au cours de l'expérimentation	45
Figure 7: évolution des volumes relatifs externes des embryons du lot témoin au cours de l'expérience.....	50
Figure 8: évolution des volumes relatifs externes des embryons du lot direct au cours de l'expérience.....	51
Figure 9: évolution des moyennes des volumes relatifs externes pour chaque lot au cours de l'expérience.....	51
Figure 10: évolution des volumes relatifs internes des embryons du lot témoin au cours de l'expérience.....	52
Figure 11: évolution des volumes relatifs internes des embryons du lot direct au cours de l'expérience.....	53
Figure 12: évolution des moyennes des volumes relatifs internes pour chaque lot au cours de l'expérience.....	53
Figure 13: évolution des notes morphologiques pour les embryons du lot témoin au cours de l'expérience.....	54
Figure 14: évolution des notes morphologiques des embryons du lot direct au cours de l'expérience.....	54
Figure 15: évolution des moyennes des notes morphologiques pour chaque lot au cours de l'expérience.....	55
Tableau 1 : récapitulatif des durées d'incorporation du glycérol de chaque lot expérimental selon les concentrations en glycérol	39
Tableau 2 : traitements des lots expérimentaux	41
Tableau 3 : gestion des embryons après collecte de la receveuse.....	42
Tableau 4 : classification qualitative des embryons équins.....	44
Tableau 5: types d'évaluation de l'embryon au cours des étapes de l'expérimentation	45
Tableau 6: diamètre externe des embryons de chaque lot à la collecte.....	49

Tableau 7: nombre d'embryons au cours des étapes de l'expérience	49
Tableau 8: bilan de l'évaluation des embryons collectés chez les receveuses.....	55
Tableau 9: résultats définitifs à la deuxième collecte	57

LISTE DES ABREVIATIONS

BSA	Bovine serum albumin
CEG	Crude Extract Gonadotrophin
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DG	Diagnostic de gestation
Dir/DIR	Direct
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
FIV	fécondation <i>in vitro</i>
GIFT	Gamet intrafallopian transfer
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
IA	Insémination artificielle
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
J11	11 ^{ème} jour après constat d'ovulation
OPS	Open pulled straw
PCR	Polymerase chain reaction
PGF2 α	Prostaglandine 2 α
RL	Ringer lactate
Tem/TEM	Témoin
ZP	Zone pellucide

1 INTRODUCTION

Les embryons préimplantatoires de mammifères ont été congelés et conservés avec succès depuis 1972, date à laquelle Whittingham et son équipe ont obtenu des sourceaux vivants après transfert de morula congelées puis décongelées. La cryoconservation embryonnaire, mise au point chez les rongeurs, a été appliquée rapidement et de façon industrielle chez les bovins. En effet, face aux exigences techniques et de productivité des filières bovines, la congélation embryonnaire a été développée afin de profiter de ses avantages pratiques et économiques. Les embryons ovins et caprins ont subi le même essor plus tardivement. Les équipes de recherche étudient désormais des techniques plus performantes de congélation pour les embryons bovins, ovins et caprins. De plus, les recherches s'orientent vers l'utilisation d'embryons produits et manipulés *in vitro*. Le retard de la congélation des embryons porcins est dû à leur sensibilité thermique à des températures inférieures à 15°C. Mais ce retard a été rattrapé par des acquis moléculaires et cellulaires concernant l'embryologie porcine.

La congélation des embryons équins est encore au stade de la recherche et n'a pas d'application commerciale. La première entrave au développement de la cryoconservation est le faible nombre d'embryons disponibles en recherche. En effet, contrairement aux bovins, les juments ne répondent pas efficacement aux traitements d'ovulations multiples. Mais la barrière principale à la congélation des embryons équins semble être la présence d'une enveloppe acellulaire glycoprotéique : la capsule. Celle-ci se forme dès l'entrée de l'embryon dans l'utérus et s'épaissit progressivement. Il apparaît selon l'équipe de Legrand (2000) que les effets néfastes de la congélation se font d'autant plus ressentir que la capsule est épaisse, ce qui confirme de nombreux travaux ayant révélé l'impossibilité de congeler des embryons d'une taille trop importante (plus de 250 µm de diamètre) et d'un âge trop avancé. En prenant modèle sur les études des embryons porcins, il faut donc travailler sur les spécificités embryologiques des chevaux afin de trouver la meilleure méthode de congélation.

Si des techniques de congélation rapide ont été essayées, la congélation conventionnelle lente reste majoritaire (Allard, 2004). Cette technique de descente lente en température permet une équilibrage des milieux extra et intracellulaires au fur et à mesure de la pénétration du cryoprotecteur et de la formation de cristaux de glace. Le cryoprotecteur est essentiel à la congélation des embryons, prévenant des dommages cellulaires mais possédant une toxicité potentielle. Le glycérol à 10% a été le plus employé. C'est un cryoprotecteur à la fois peu toxique et efficace.

Mais même avec ce cryoprotecteur, la congélation des embryons de grande taille ne donne pas de résultats satisfaisants et celle des jeunes embryons ne permet pas une utilisation commerciale. Récemment, Lascombes et Pashen (2000) ont réalisé un modèle de cryopréservation commerciale avec un taux de gestation de 54%. Leur technique était une congélation conventionnelle utilisant du glycérol 10%. Même si d'autres techniques de congélation sont à exploiter, travailler sur une technique de congélation classique permet d'affiner nos connaissances sur le point faible de la cryopréservation équine : les flux de cryoprotecteur à travers la capsule.

L'étape d'incorporation du cryoprotecteur a déjà donné lieu à quelques études. Allard (2004) a étudié le temps de contact entre le glycérol et l'embryon ainsi que le nombre d'étapes de concentration croissante jusqu'à la mise en contact avec une solution de glycérol

10%. Ces études de viabilité des embryons après décongélation via un décompte de cellules mortes ont révélé qu'une immersion directe dans du glycérol 10% serait moins néfaste qu'une incorporation progressive de ce cryoprotecteur.

L'étude suivante reprend un protocole similaire mais avec une mise en place chirurgicale des embryons dans les utérus de receveuses. Ceci qui permet de réaliser un contrôle *in vivo* de la supériorité éventuelle d'une incorporation directe. Les taux de gestation à 11 jours ont pu être comparés après une nouvelle collecte des embryons effectivement développés.

L'essentiel des données sur la congélation des embryons équins est présenté dans un premier temps. Dans une deuxième partie, l'étude expérimentale est développée. Enfin, les résultats sont donnés et discutés.

2 INTRODUCTION AU SUJET ET PRESENTATION DE LA QUESTION

2.1 Avantages et intérêts du transfert d'embryons cryopréservés

Les techniques de reproduction assistée (IA, FIV, GIFT, ICSI...) peuvent être mises en oeuvre à différents moments de la chronologie de la formation d'un embryon. Le transfert embryonnaire, plus particulièrement celui d'embryons cryopréservés, s'intéresse au stade blastocyste, juste après le passage de la jonction utéro-tubaire. Le principe du transfert est de collecter un blastocyste obtenu après une fécondation *in vivo* d'une donneuse puis de le replacer dans l'utérus d'une autre jument, dite porteuse ou receveuse, synchronisée avec la première.

Le transfert embryonnaire apporte de nombreux avantages à la reproduction des équidés (Mc Kinnon, 1993) :

- il permet d'obtenir des gestations de juments trop âgées ou ayant des pathologies contradictoires au maintien d'une bonne gestation
- il permet d'augmenter la descendance de juments à haut potentiel génétique
- il autorise la mise à la reproduction de jument à deux ans ; on avance ainsi d'un an l'utilisation de la reproductrice
- les femelles récoltées peuvent poursuivre leurs activités sportives pendant la saison sans être obligées d'être arrêtées pour cause de gestation
- l'obtention de plusieurs produits d'une même jument pendant une saison est réalisable et permet par conséquent de pouvoir évaluer la fertilité d'un étalon plus rapidement
- l'exploitation de plusieurs cycles d'une même jument par un même étalon implique la production d'individus génétiquement proches qui pourront ainsi être exploités en recherche ; on s'affranchit du facteur de variabilité individuelle
- l'utilisation dans le cadre de sauvegarde de races est aussi à souligner.

Outre ces intérêts médicaux, commerciaux, scientifiques et génétiques, la congélation des embryons présente d'autres avantages : elle allège le transfert embryonnaire dans la gestion des receveuses. Il est ainsi possible de ne pas avoir, sur le même site, donneuses et receveuses (avantage déjà présent avec les embryons réfrigérés). La congélation évite les problèmes de synchronisation des cycles et de ce fait permet de diminuer le nombre du troupeau de receveuses. Commercialement, on trouve une plus grande flexibilité quant à l'importation et l'exportation des embryons. Enfin, à - 196°C, la conservation des embryons permet un stockage de matériel génétique d'une durée supposée infinie.

2.2 Historique et données chiffrées

Les techniques de transfert embryonnaire sont apparues dans les années 1970. Concernant la congélation, les premiers embryons de mammifères congelés furent ceux de souris en 1972 par Whittingham *et al.*. Les embryons d'autres espèces ont par la suite été congelés. Concernant le porc et le cheval, le succès a été moins immédiat et moins total. Ceci

est dû à des particularités biologiques du matériel à congeler. De plus, dans le cas des équidés, le faible développement de la technique résulte des interdictions par les stud-books. En effet, même pour le transfert d'embryons frais, les stud-books ont freiné le développement de ces techniques. L'aval donné par l'association du Quarter Horse américain en 2002 a participé à un déblocage, mais il n'en reste pas moins qu'en France, le transfert d'embryons frais demeure interdit dans certaines races (Pur Sang, Trotteur Français, Camargue, Cheval de Henson, Barbe, Lusitanien, Shagya, Haflinger, Highland, Shetland et Fjord) (Bruyas, 2004).

Actuellement, les pays leaders du transfert embryonnaire sont les Etats Unis, l'Argentine et le Brésil (Squires *et al.*, 2003). Une estimation faite par l'IETS (International Embryo Transfer Society) conclut à 20 000 transferts équins réalisés à travers le monde en 2003 (Bruyas, 2004). En comparaison, pour les bovins et seulement sur 23 pays européens, on dénombre 99 000 embryons transférés et 54 % de ces transferts ont été réalisés après congélation.

Du côté équin, le premier poulain né d'un transfert d'embryon cryopréservé date de 1982 (Yamamoto *et al.*). Un poulain est né sur 11 transferts d'embryons de 6 jours cryopréservés avec du glycérol. Les techniques de cryoconservation utilisées découlent de celles des autres espèces mais contrairement aux bovins, il n'est pas encore question de congélation commerciale des embryons équins. Cependant, il serait possible d'atteindre un taux de l'ordre de 50% de gestation dans un modèle commercial (Lascombes *et al.*, 2000). De nombreux problèmes se posent encore face aux techniques de congélation que nous allons aborder.

2.3 Principe et techniques de cryopréservation

2.3.1 Principe

2.3.1.1 La congélation

L'objectif est d'atteindre la température de – 196°C dans de l'azote liquide. A cette température la plupart des réactions chimiques sont inhibées et l'activité métabolique cellulaire est suspendue (Mandelbaum, 1999). Seules les radiations terrestres et des virus pourraient perturber une conservation illimitée (Shaw, 2000).

Cependant la descente de température produit de nombreux effets délétères sur les cellules de l'embryon. En effet, le comportement de l'eau libre intra et extra cellulaire au cours des changements de phase est responsable de phénomènes physico-chimiques remarquables.

La congélation se fait au cours d'une descente en température jusqu'à un point où il y a transformation de l'eau libre en cristaux de glace. Pour les cellules embryonnaires, cette réaction exothermique se fait à une température dite de surfusion, inférieure à celle du point de congélation de l'eau pure. Les cristaux se forment de façon extracellulaire dans un premier temps (Fahy, 1995). La membrane cellulaire empêcherait la croissance des cristaux extracellulaires dans la cellule (Mazur, 1970). La pression de vapeur étant plus élevée à l'intérieur (eau en surfusion toujours liquide par rapport au milieu extracellulaire), les cellules

s'équilibrent en se déshydratant progressivement. Mais si la diminution de température est trop rapide, cette équilibration des pressions se fait par formation de cristaux de glace intracellulaires (Mazur, 1970). Ces cristaux cellulaires engendrent des dommages mécaniques au niveau de la membrane plasmique (Seidel, 1996).

Suite à la formation des différents cristaux, il y a moins d'eau libre, les solutés se concentrent et peuvent précipiter. Cela conduit à des variations de pH et de concentration des sels dissous ; c'est ce qui est appelé l'effet solution. Cet effet solution est une seconde cause de dommages cellulaires dont l'origine est soumise à hypothèses et concerne la membrane cellulaire (Mazur, 1970).

Il existe un autre effet néfaste au cours de la chute de température : la déshydratation des cellules embryonnaires. Elle suit les lois de l'osmose et qui, si elle dépasse 60%, produit des lésions irréversibles du cytosquelette et la mort cellulaire (Mandelbaum, 1999).

Face à ces contraintes de descente en température, plusieurs solutions sont envisageables :

- contrôler la cinétique de refroidissement :

Il existe un point critique de la vitesse de refroidissement quant au pourcentage de survie des cellules congelées qui dépend du type de cellules congelées et du cryoprotecteur ajouté (Mazur, 1985).

Les cellules refroidies trop rapidement n'ont pas le temps de se déhydrater pour éviter la formation de cristaux de glace intracellulaires. Mais pour les cellules refroidies trop lentement les concentrations des sels (et du cryoprotecteur) deviennent élevées et toxiques (effet solution pour les sels). Il est donc nécessaire de trouver une courbe de refroidissement adaptée.

- réaliser une protection physico-chimique :

L'ajout de certaines molécules dites cryoprotectrices peut abaisser le point de congélation des solutions, réduire l'effet solution et limiter la vitesse de croissance des cristaux de glace (Mandelbaum, 1999). Des cryoprotecteurs perméables sont très utilisés comme le glycérol, le diméthyl sulfoxyde, le propanediol ou l'éthylène glycol. Il existe aussi des molécules qui ne pénètrent pas dans les cellules comme des molécules de sucre (sucrose, galactose...) ou des protéines et lipoprotéines. Elles agissent surtout sur l'établissement d'équilibres osmotiques et la réduction des cristaux de glace, moins traumatisants.

D'autres molécules peuvent être employées pour potentialiser les effets des premiers cryoprotecteurs tels que les AFP (antifreezing proteins) (Lagneaux *et al.*, 1997), la glutamine (Lagneaux *et al.*, 2000) ou des molécules non perméables de poids moléculaires importants (polyvinylpyrrolidone, dextran, composants protéiques du sérum...).

- contrôler le volume cellulaire :

Au cours de la congélation, la pression osmotique extracellulaire augmente et les cellules se déshydratent : leur volume se réduit donc. De plus, lorsque l'embryon est placé dans la solution de cryoprotection, il subit un choc osmotique avec un flux d'eau vers le milieu extracellulaire. La cellule se déhydrate et il se produit en retour un appel d'eau lié au

cryoprotecteur qui a pénétré les cellules. Lors de cette phase de rééquilibration, le volume des cellules, après avoir diminué, tend à retrouver son état initial sans y parvenir complètement (Hochi *et al.*, 1994).

Afin de minimiser ces variations de volume qui pourraient être néfastes au développement embryonnaire, après transfert (Huhtinen *et al.*, 1997), il faut premièrement contrôler la cinétique. Deuxièmement, on peut jouer sur l'ajout progressif de cryoprotecteur (voir paragraphe 2.5.2). Ensuite, les cryoprotecteurs extracellulaires trouvent ici leur importance en contrebalançant l'appel d'eau intracellulaire des cryoprotecteurs intracellulaires.

- induire la cristallisation (« seeding »):

En induisant la formation des premiers cristaux de glace à -7°C, on évite la surfusion des cellules embryonnaires qui entraînerait une cristallisation à des températures de -15°C (Shaw, 2000). Cette cristallisation spontanée à -15 °C conduirait à la formation de gros cristaux intra et extra cellulaires néfastes à la survie des cellules (Seidel, 1996). Le « seeding » se pratique le plus souvent manuellement en plaçant des pinces refroidies à l'azote liquide sur la paroi externe de la paillette qui contient l'embryon, loin de celui-ci. On induit ainsi la formation d'un premier cristal de glace loin de l'embryon et on enclenche la déshydratation des cellules afin d'éviter la formation de gros cristaux de glace intracellulaires. Le «seeding » permet aussi d'évacuer plus progressivement la chaleur latente de la cristallisation exothermique (Shaw, 2000).

2.3.1.2 La décongélation

La phase de décongélation présente aussi des risques, notamment une recristallisation. Ce phénomène de recristallisation débute lors de la montée en température à partir de -120°C: de nouveaux cristaux de glace apparaissent et les anciens vont croître (Shaw, 2000). Cette recristallisation est importante s'il reste beaucoup d'eau intracellulaire (refroidissement rapide) ; il faut alors réchauffer plus rapidement. Au contraire, lors d'un refroidissement lent, les cellules se sont déhydratées suffisamment pour minimiser cet effet de recristallisation (Mazur, 1985). Il est donc nécessaire d'adapter le programme de décongélation à celui de congélation.

Le choc osmotique est un deuxième risque survenant à la décongélation : si celle-ci se fait trop rapidement au niveau extracellulaire, les solutés intracellulaires n'ayant pas le temps de sortir, l'eau extracellulaire rentre et peut provoquer l'explosion de la cellule (Mazur, 1985).

La loi de l'équilibre osmotique intervient aussi lors du retour des cellules dans un milieu physiologique hypotonique afin de retirer le ou les cryoprotecteurs pénétrants. Les cellules contenant du cryoprotecteur ont tendance à gonfler et peuvent se lyser. Il faut empêcher cet afflux d'eau intracellulaire en diminuant progressivement la concentration extracellulaire. On peut alors jouer soit sur une concentration décroissante en cryoprotecteur, soit sur l'ajout d'une molécule non pénétrante qui attire l'eau vers le milieu extracellulaire pour contrebalancer son entrée (Seidel, 1996). La combinaison d'une concentration

décroissante en glycérol et en sucre lors du retrait du cryoprotecteur semble réduire le nombre de cellules mortes après cryoconservation (Huhtinen *et al.*, 1997).

2.3.2 Protocoles

On peut distinguer trois types de protocoles de congélation et décongélation (Figure 1). Les deux étapes sont indissociables car la décongélation dépendra du mode de congélation.

2.3.2.1 La congélation lente

Cette congélation classique est dite « équilibrée ». Les embryons sont exposés à des concentrations croissantes d'un cryoprotecteur jusqu'à atteindre l'équilibre des concentrations de cryoprotecteur intra et extracellulaire. Parallèlement les cellules se déshydratent progressivement évitant la future formation de cristaux de glace intracellulaire. La descente en température est de 1 à 3°C par minute, en partant de la température ambiante jusqu'à -7°C où la cristallisation est induite par « seeding ». On ne descend ensuite que de 0.1 à 0.3°C par minute jusqu'à -30°C où l'embryon est alors plongé dans l'azote liquide. La décongélation se fait généralement dans un bain marin de 37°C puis on retire progressivement le cryoprotecteur avec différents bains.

C'est un procédé qui est simple et où le cryoprotecteur avec de faibles concentrations est peu toxique. Son inconvénient majeur est sa lenteur. Elle est utilisée pour les embryons ovins, bovins, caprins et équins.

2.3.2.2 La congélation rapide

On parle désormais de congélation « non équilibrée ». Ses principes sont de fortes concentrations de cryoprotecteurs (souvent un mélange), pour déshydrater rapidement les cellules, et des vitesses de refroidissement rapides (2500°C par minute). En général, le temps d'équilibration est court. L'embryon, partiellement déshydraté, est refroidi rapidement et plongé dans l'azote liquide. Des cristaux de glace intracellulaires peuvent alors se former (à la congélation ou à la décongélation) et il est nécessaire d'avoir une vitesse de décongélation rapide pour éviter de détériorer l'embryon. La solution cryoprotectrice est alors enlevée en une seule étape le plus souvent.

C'est une méthode qui n'est pas employée pour la cryoconservation des embryons équins.

2.3.2.3 La vitrification

Les principes sont les mêmes que pour la congélation rapide cependant aucun cristal de glace ne se forme au cours des procédures de congélation-décongélation (Figure 1). Cela se produit pour des concentrations de cryoprotecteurs élevées (supérieures à 40%, Shaw, 2000). Lors du passage de la température ambiante à -196°C, l'eau libre et les solutés dissous forment une phase vitreuse (Mandelbaum, 1999).

C'est une technique très rapide et peut être plus adaptée à des embryons sensibles (Guignot, 2003) mais les cryoprotecteurs sont employés à des doses très toxiques et le manipulateur doit être suffisamment expérimenté pour ces manipulations rapides.

Afin d'avoir des vitesses de congélation rapides, l'embryon doit être congelé dans un volume très faible. Deux techniques plus récentes proposent des contenants d'embryon de volume plus faible qui permettent d'augmenter la vitesse de congélation (20000°C/min pour la congélation) avec une efficacité équivalente à la méthode de congélation conventionnelle (Oberstein *et al.*, 2001). Ces techniques emploient les systèmes suivants :

- l'OPS (Open Pull Straw ; premières survies d'embryons bovins à la technique OPS par Vajta *et al.*, 1997 et premières gestations par Vajta *et al.*, 1998)
- le « cryoloop».

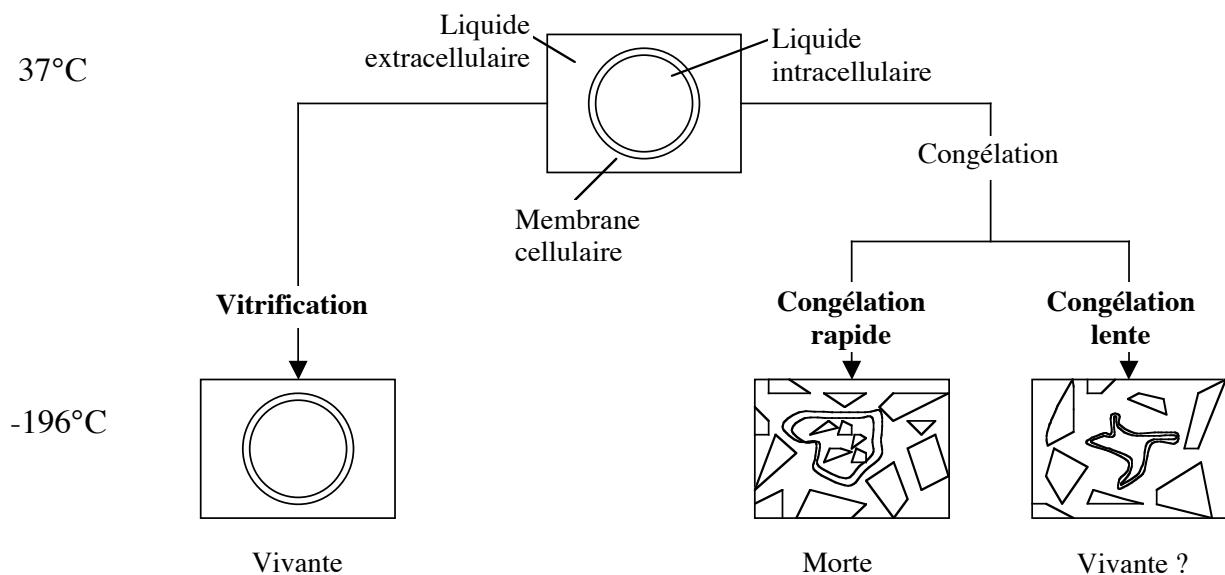


Figure 1: variations physicochimiques des cellules au cours de la congélation (d'après Fahy, 1995)

2.4 Les limites de la congélation des embryons équins

Seidel *et al.* en 1989 montrent qu'au-delà d'un diamètre embryonnaire de 250 µm les résultats de survie embryonnaire à la congélation diminuent. La taille de l'embryon mais aussi son stade de développement (Legrand *et al.*, 2000) sont des limites à la congélation classique et aussi à la vitrification (Hochi *et al.*, 1995, Carraciolo di Brienza *et al.*, 2003).

Plusieurs hypothèses concernant l'échec de la congélation des embryons de grande taille sont évoquées.

Le faible rapport surface/volume des gros embryons serait contraire à une bonne pénétration du cryoprotecteur (Pfaff *et al.*, 1993).

Le changement brutal de tolérance à la cryopréservation vers 250 µm serait corrélé à l'apparition de la capsule, couche acellulaire de glycoprotéines entre le trophoblaste et la zone pellucide. Cette enveloppe tertiaire spécifique de l'espèce équine s'épaissit jusqu'à 18 jours

puis régresse pour disparaître vers 23 jours. Maintenant la forme sphérique de l'embryon, elle aurait pour rôle une protection physique mais aussi une protection vis à vis des microorganismes et des réactions immunologiques maternelles au cours de la phase mobile de l'embryon. La capsule faciliterait la migration utérine et participerait au dialogue foeto-maternel. De ce fait, elle est essentielle au développement *in vivo* de l'embryon (Stout *et al.*, 2005). Cependant, la capsule empêcherait le flux osmotique entre l'embryon et le milieu, ce qui a été mis en évidence par l'étude des variations du volume des embryons. Hochi *et al.* (1994) mettent en évidence une réponse des variations de volumes beaucoup plus rapide pour les petits embryons. De même, Pfaff *et al.* (1993) montrent que les gros embryons plongés dans le milieu contenant le cryoprotecteur, malgré un temps d'attente long, ont du mal à retrouver leur volume initial : l'eau intracellulaire sort dans un premier temps mais le cryoprotecteur ne pénètre pas en quantité suffisante pour que le flux d'eau inverse permette aux gros embryons de retrouver leur volume initial.

Une autre origine probable du mauvais résultat de la congélation des gros embryons est la faible résistance des cellules du bouton embryonnaire à la congélation, contrairement à celle du trophoblaste (Bruyas *et al.*, 1993).

La taille et le stade de développement étant des facteurs limitants, il faut donc réussir à collecter des embryons jeunes (morula, jeune blastocyste) ou contourner les mécanismes responsables des faibles résultats avec les gros embryons.

2.5 Les points de recherche actuels sur la cryoconservation des embryons équins

2.5.1 En amont de la congélation

Face aux échecs de congélation des embryons de grandes tailles, il est essentiel de contrôler le moment de collecte des embryons. Lagneaux *et al.* (1991) observent des taux de collecte significativement supérieurs à 6,75 jours après ovulation par rapport à 6,25 jours. Les embryons collectés après une induction hormonale sont de tailles plus homogènes et, à 6,25 jours, on obtient des morula ; stade optimal pour être congelé. Il reste donc un problème de sélection des jeunes embryons sachant que le diamètre, l'âge, le stade de développement et le nombre de cellules ne sont pas corrélés (Bruyas *et al.*, 1999).

2.5.2 Congélation et décongélation au sens strict

Le relatif échec de la cryopréservation des embryons équins comparé à celle des autres espèces a conduit aux axes de recherche suivants :

- Les techniques d'évaluation de l'embryon :

La remise en place de l'embryon suivi d'un diagnostic de gestation est le seul moyen de juger de l'efficacité du traitement de cryoconservation. Aucune technique d'évaluation n'a réellement permis de prévoir la viabilité d'un embryon après décongélation et avant transfert.

Une telle technique permettrait d'économiser les receveuses. Des techniques de coloration vitale (DAPI : colorant des cellules mortes) sont utilisées mais c'est surtout la classification morphologique (état des enveloppes externes, degré de contraction de l'embryon, proportion de cellules exclues...) qui reste majoritairement employée. Elle est cependant très subjective.

- Les traitements des embryons avant ajout du cryoprotecteur :

Des études sur les variations de volume et de l'ultrastructure (Dobrinsky, 1996 ; Ferreira, 1997) à l'ajout du cryoprotecteur conduisent à penser :

- qu'il faut traiter la capsule afin que le cryoprotecteur pénètre plus facilement
- qu'il faut également remanier le cytosquelette avant l'ajout du cryoprotecteur afin qu'il ne subisse pas de dommages trop importants.

Concernant la capsule, Seidel (1996) émet l'hypothèse de travailler sur l'injection intra blastocèle du cryoprotecteur afin d'échapper à l'effet néfaste de la capsule sur la perméabilité au cryoprotecteur, mais aucune étude n'est recensée à ce sujet.

En revanche, la digestion enzymatique de la capsule est soumise à étude. Legrand *et al.* (2000) observent la supériorité d'un traitement à la trypsine comparé à celui avec des collagénases sur la qualité des embryons après cryoconservation. Ils obtiennent des résultats positifs (6 gestations sur 8 à 16 jours à partir d'embryons de 8 jours) avec de la trypsine (bain à 0,2 %) en congélation conventionnelle au glycérol 10%. Legrand *et al.* (2002) réitèrent cette expérience avec des résultats plus faibles (3 gestations sur 11 transferts). Maclellan *et al.* (2002) n'obtiennent aucune gestation dans les lots expérimentaux où la trypsine est employée. Ces résultats moins encourageants seraient plus la conséquence d'un trop grand affaiblissement de la capsule, essentielle à la survie intra utérine des embryons, qu'à une inefficacité du traitement (Stout *et al.*, 2005). Les effets positifs de la trypsine sur la conservation de la qualité du cytosquelette des cellules embryonnaires au cours de la cryoconservation ont été mis en évidence par Tharasanit *et al.* (2005).

Concernant le cytosquelette, la cytochalasine-B, en dépolymérisant l'actine des microfilaments de façon réversible, préviendrait la rupture des microfilaments et de la membrane plasmique au cours de la cryoconservation. Maclellan *et al.* (2002) obtiennent ainsi 3 gestations sur 7 transferts en traitant des embryons de plus de 300 µm avec cet inhibiteur des microfilaments. Tharasanit *et al.* (2005) montrent par une coloration DAPI que l'effet taille disparaît quant au pourcentage de cellules mortes après cryoconservation si un traitement à la cytochalasine-B est effectué.

- Les additifs aux cryoprotecteurs de base :

Les solutés non perméables comme le sucre ont un intérêt démontré surtout à la décongélation (Seidel *et al.*, 1996 ; Huhtinen *et al.*, 1997). Ils minimisent les effets osmotiques au cours du passage dans les bains de retrait du cryoprotecteur (tendance à l'entrée d'eau compensée).

L'AFP (antifreeze protein) est une molécule extraite des poissons de l'Antarctique et leur permet de vivre à des températures négatives. Elle abaisserait le point de congélation, modifierait la structure des cristaux de glace et protégerait les membranes cellulaires. En considérant les avantages que cette molécule apporte aux poissons et les résultats d'utilisation sur la congélation d'embryons d'autres espèces, Lagneaux *et al.* (1997) ont testé cette AFP sur les embryons équins. Mais aucune amélioration n'a été notée à la coloration DAPI et une dégradation morphologique a même été observée lors de l'emploi de l'AFP.

La L-glutamine pourrait être un autre additif aux cryoprotecteurs, agissant indépendamment d'eux et ne protégeant que si elle est ajoutée durant le cycle congélation-décongélation (Kruuv *et al.*, 1988). L'ajout de cette molécule au milieu de congélation permettrait ainsi de diminuer la concentration des autres cryoprotecteurs, réduisant ainsi leurs effets cytotoxiques. D'après les auteurs cités précédemment, le mode d'action de la glutamine dépendrait plus d'une protection des protéines membranaires vis à vis d'une dénaturation thermique qu'à un effet métabolique. Les expériences de Lagneaux *et al.* (2000) confirment un effet positif de l'ajout de L-glutamine par un taux de gestation à 14 jours de 60 % pour une concentration de glutamine ajoutée de 100 mmol.l⁻¹, associé à un taux de cellules mortes moindre. Le mécanisme exact de la protection par la L-glutamine n'est pas décrit et la concentration optimale reste à explorer ; cependant son avantage est à exploiter de façon empirique.

- Les techniques de congélation :

L'exploration de la technique de vitrification se poursuit. Castanheira *et al.* (2004) ont observé que l'ajout de ficoll, sucre ou tréalose au milieu de congélation améliorait *in vitro* la qualité des embryons vitrifiés de 6,5 jours. Carnevale *et al.* (2004) ont travaillé sur la taille des embryons vitrifiés et sur le retrait du cryoprotecteur en évaluant *in vivo* les gestations à 16 jours. Aucune gestation n'a été relevée pour les embryons de plus de 300 µm et le transfert direct sans bain de dilution au retrait du cryoprotecteur semble être une technique efficace. La technique de vitrification est bien efficace pour les petits embryons comme Caracciolo di Brienza *et al.* (2003) l'avaient montré précédemment *in vivo*.

L'OPS et le cryoloop (méthodes de congélation ultrarapide dans un très faible volume de milieu) donnent toujours des résultats équivalents à la congélation lente (Oberstein *et al.*, 2001 ; Moussa *et al.*, 2004) mais n'ont pas encore été testées après transfert, *in vivo*.

- Les cryoprotecteurs :

- Nature du cryoprotecteur (en congélation conventionnelle)

En congélation lente, l'efficacité et la toxicité des différents cryoprotecteurs ont été étudiées depuis longtemps.

Le glycérol reste le cryoprotecteur le plus employé et le seul ayant abouti à la naissance de poulains après une méthode de cryoconservation conventionnelle (Seidel, 1996). Certes, il est toxique pour les cellules même sans traitement thermique (Bruyas *et al.*, 1993, Rieger *et al.*, 1991), voire même plus toxique que l'éthylène glycol (Pfaff *et al.*, 1993). Il reste

cependant d'une plus grande efficacité. Meira *et al.* (1993) montrent ainsi qu'il est supérieur au propanediol.

Le 1-2-propanediol est peu toxique mais également peu cryoprotecteur d'après une étude morphologique de Bruyas *et al.* (1997). Son ajout à une solution contenant du glycérol ne conduit à aucune gestation (Ferreira *et al.*, 1997).

L'éthylène glycol présente une bonne perméabilité que Pfaff *et al.* (1993) ont mis en évidence par un retour rapide du volume des embryons à leur volume initial lors de l'ajout du cryoprotecteur (même pour les embryons de taille moyenne (250-500 µm)). Les résultats restent cependant mitigés selon les équipes (Hochi *et al.*, 1997 ; Bruyas *et al.*, 2000 ; Huthinen *et al.*, 2000).

Le DMSO ne semble pas être un bon cryoprotecteur pour les jeunes blastocystes d'après une étude histologique de Bruyas *et al.* (1997).

L'emploi de méthanol récemment étudié (Bass *et al.*, 2004) donne des résultats équivalents à la congélation lente avec du glycérol 10%.

On constate qu'une faible toxicité et une bonne perméabilité ne sont pas des critères suffisants ; il faut aussi que le cryoprotecteur soit efficace. C'est alors que le glycérol voit son intérêt, à une concentration de 1,5M (Legrand *et al.*, 1999) et serait proposable en programme commercial (Lascombes *et al.*, 2000).

Le choix du meilleur cryoprotecteur pour un type cellulaire donné repose donc sur sa perméabilité et sa toxicité, qui varient avec la température, et sur son efficacité biologique déterminée empiriquement.

- Méthodes d'incorporation et de retrait du cryoprotecteur

Avant la congélation, l'incorporation directe de la concentration finale de cryoprotecteur semblerait donner des résultats intéressants avec le glycérol, en congélation classique (Allard, 2005). Si l'on considère que la capsule fait barrière à la pénétration du cryoprotecteur, il faut essayer de la forcer soit en ajoutant directement la concentration finale comme précédemment, soit en pratiquant une technique de « step-down equilibration ». Young *et al.* (1997) ont ainsi imposé dans un temps restreint une concentration élevée de glycérol à de gros embryons ; ce qui a donné des résultats de grades morphologiques encourageants pour la congélation des embryons de grandes tailles.

Seidel, en 1996, propose d'étudier plus précisément la pénétration des cryoprotecteurs en utilisant des molécules radiomarquées. C'est une piste peu exploitée pour l'instant.

Après la décongélation, il semblerait intéressant de pouvoir faire un transfert direct, sans expulsion de la paillette si la solution de dilution est incluse dans la paillette. Pour les embryons bovins, cette méthode a été utilisée avec succès dès 1984 par Leibo *et al.* puis réitérée par d'autres. Hochi *et al.* (1996) ont adapté ce transfert direct aux embryons équins avec un mélange d'éthylène glycol et de sucre en tant que cryoprotecteur : ils ont obtenu des taux de gestation à 15 jours de 63,6 %. Le transfert direct ne diminue pas non plus le taux de gestation à 16 jours après vitrification d'après Eldridge-Panuska *et al.* (2005). Cette technique de transfert direct simplifie le transfert conventionnel en excluant l'utilisation d'un microscope et de dilutions par étape hors de la paillette après la décongélation.

2.6 Présentation de l'étude expérimentale

Les échecs de congélation de gros embryons mettent en évidence l'importance d'une bonne pénétration du cryoprotecteur. Plus que les courbes de refroidissement et de décongélation, ce sont les étapes d'ajout et de retrait des cryoprotecteurs qui sont à contrôler, même avec les embryons de petite taille. Le retrait en une étape a déjà été évoqué. On se penchera donc sur la phase d'ajout du cryoprotecteur.

Une étude préliminaire (Allard, 2004) a déjà testé l'ajout de glycérol à 10% en une étape, comparé à un protocole de référence en quatre étapes de congélation lente (Lagneaux *et al.*, 2000). Le transfert direct dans du glycérol à 10% tendait à améliorer la viabilité des embryons congelés alors qu'on aurait pu prévoir un risque de choc osmotique accru du fait de l'ajout en une étape. C'est pourtant bien en augmentant la différence de concentration de cryoprotecteur entre le milieu extracellulaire ($[CP]_{ext}$) et intracellulaire ($[CP]_{int}$) que l'on augmentera le flux de cryoprotecteur . La formule suivante illustre ce propos :

$$\text{Flux de cryoprotecteur} = P_{\text{glycérol}} \cdot A \cdot ([CP]_{ext} - [CP]_{int})$$

$P_{\text{glycérol}}$: perméabilité du glycérol

A : surface des cellules

CP_{ext} : concentration extracellulaire du cryoprotecteur

CP_{int} : concentration intracellulaire du cryoprotecteur

(Schneider et Mazur, 1984)

Cette étude préalable a conclu à un pouvoir améliorant de l'ajout direct de cryoprotecteur sur la qualité de l'embryon après décongélation. Cette qualité a été évaluée par la classification morphologique de l'embryon, ses variations de volumes interne et externe, le pourcentage de cellules mortes par coloration DAPI et la mise en culture. Toutes ces évaluations restent trop subjectives (classification morphologique) ou peu représentatives du développement embryonnaire *in vivo*. L'évaluation ultime reste le diagnostic d'une gestation viable après transfert dans une receveuse. L'étude présentée ici a donc essayé de confirmer les résultats positifs d'ajout direct de glycérol à 10% en étudiant la viabilité *in vivo* des embryons après transfert dans des receveuses.

En étudiant une congélation lente dans du glycérol 10% sur des embryons de petite taille, l'objectif a été de confirmer *in vivo* la supériorité d'une technique d'ajout direct du cryoprotecteur.

3 MATERIEL ET METHODE

Dans cette expérience, des embryons de petites tailles ont été congelés avec 2 techniques d'ajout du cryoprotecteur. Après décongélation, des paires d'embryons (un de chaque lot) ont été mises dans l'utérus de ponettes receveuses par voie chirurgicale. Puis les embryons ont été collectés à leur 11^{ème} jour de vie (J11). Leur parenté a été estimée si besoin afin de retrouver le lot d'origine.

3.1 Gestion des animaux

3.1.1 Les ponettes donneuses et receveuses

Quatre-vingts ponettes Welsh du troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly, âgées de 5 à 17 ans, ont été utilisées comme donneuses d'embryons. La sélection s'est faite au cours du suivi échographique des cycles de reproduction d'un échantillon plus large de ponettes, dont l'état de santé était normal et le passé de reproductrice connu. Les examens échographiques se sont déroulés de janvier 2005 à avril 2005 pour la sélection des donneuses. Un ou plusieurs cycles par ponette ont été exploités afin de produire des embryons.

Le transfert est effectué sur 22 ponettes Welsh du même âge, appartenant au même troupeau, d'avril 2005 à juillet 2005. Leur passé de reproductrice n'évoque pas de problème de gestation. Le stade du cycle sexuel des ponettes est déterminé au préalable au cours des examens échographiques réguliers. La chirurgie de transfert des embryons congelés est alors réalisée entre J5 et J6 après ovulation. On évite d'utiliser une ponette ayant déjà été soumise à une chirurgie afin de ne pas avoir de problème d'adhérences.

3.1.2 Maîtrise artificielle des cycles

Plusieurs traitements ont été employés dans le but d'exploiter le maximum de cycles et de réaliser les inséminations avec précision.

Du cloprosténol (Estrumate®) était administré à 125 µg (0,5 ml) par voie intramusculaire 5 jours minimum après ovulation constatée afin de raccourcir le dioestrus et d'exploiter plus de cycles, ou après détection de corps jaunes.

La CEG (Crude Extract Gonadotrophin), extrait hypophysaire équin, est employée à Nouzilly afin d'induire une ovulation dans les 36 heures en moyenne sur des follicules dominants d'au moins 33 mm, repérés à l'échographie. La CEG présente l'avantage de ne pas induire une réponse immunitaire contrairement à l'hCG (human ChorioGonadotropin). Lors injections répétées d'hCG, la synthèse d'anticorps rend les juments réfractaires à son action ovulatoire (Duchamp *et al.*, 1987). La CEG était administrée à la dose de 15 mg par ponette par voie intraveineuse. L'injection était réalisée avant 9 heures du matin afin d'inséminer les ponettes le lendemain en début d'après-midi, après contrôle échographique de la présence du follicule préovulatoire.

3.1.3 Les échographies

Dès que les ponettes débutaient leur premier oestrus de la saison (déttection par le premier dosage de progestéronémie positif), leur croissance folliculaire était suivie régulièrement. Une sonde échographique de 5MHz était utilisée.

Des échographies ont été réalisées tous les 2 à 3 jours en début de cycle.

Quand un follicule atteignait 25 mm de diamètre, on prévoyait des échographies quotidiennes deux jours plus tard, afin de détecter un follicule d'au moins 33 mm (sachant que la croissance folliculaire est de l'ordre de 3 mm par jour).

Une échographie était réalisée le jour de l'insémination (follicule de 33 mm) afin de vérifier que l'ovulation ne s'était pas produite. De même, le lendemain de l'insémination, on contrôlait l'ovulation par la mise en évidence d'un corps jaune récent. Il était alors prévu une injection de prostaglandine 5 jours plus tard.

La présence d'un follicule lutéinisé (structure de grand diamètre, ne présentant aucune croissance et laissant apparaître des points échogènes en son centre) était traitée comme un follicule ayant ovulé.

3.1.4 Calendrier des interventions

Les échographies et autres interventions ont été réalisées selon la chronologie suivante pour les ponettes donneuses:

J-2 : Injection de CEG après détection d'un follicule dominant préovulatoire à 9 h du matin

J-1 : Insémination artificielle après constat de la présence du follicule préovulatoire entre 13h et 15h

J0 : Constat d'ovulation le matin

J6 : Collecte embryonnaire entre 14h et 15h et injection de prostaglandine

J11 minimum : Redémarrage du suivi échographique.

3.1.5 Les inséminations

Les ponettes ont été inséminées en semence fraîche à la dose de 400 millions de spermatozoïdes dans le dilueur HGLL-BSA (Magistrini *et al.*, 1992). Trois étalons fertiles ont été utilisés afin de les répartir ensuite équitablement selon les lots expérimentaux et de faciliter la détermination de parenté associée au lot. L'avantage d'avoir trois étalons à disposition sera évoqué par la suite lors de la répartition des paillettes d'embryons congelés et de la mise en place chez les receveuses.

3.2 Collecte des embryons

On a utilisé ici une technique très courante de collecte embryonnaire non chirurgicale par voie cervicale (Imel *et al.*, 1981), issue de celle du transfert embryonnaire bovin et peu modifiée depuis ses débuts.

3.2.1 Age des embryons collectés

La collecte se réalise 6 jours après le constat de l'ovulation soit à l'âge de 6,75 jours pour les embryons (on comptabilise les 6 jours auxquels on rajoute les heures entre ovulation et constat d'ovulation et celles entre les 6 jours nets post constat d'ovulation et la collecte de l'après-midi).

3.2.2 Matériel

L'ensemble du matériel nécessaire à une collecte est présenté sur la Figure 2, réparti sur une table tout comme il l'est avant de commencer les opérations. Il s'agit de : une sonde de collecte Bivona stérile (IMV, L'aigle), une seringue de 50 ml, trois clamps, une paire de ciseaux, du lubrifiant stérile (gel KY®), trois poches de Ringer lactate Aguettant (RL) de 500 ml. A cela il faut ajouter une paire de gants d'exploration transrectale stériles et d'autres non stériles, du gel lubrifiant pour le rectum, et une étuve de petite taille où l'on place les poches de RL conservées à 37°C.



Figure 2 : matériel de collecte embryonnaire cervicale

L'étanchéité du ballonnet de la sonde est vérifiée avant de commencer la collecte en utilisant la seringue de 50 ml et l'embout pour la gonfler.

3.2.3 Méthode

Les vulves des ponettes sont préparées selon la procédure préalable à une insémination artificielle.

La poche de RL raccordée à la sonde est accrochée à l'envers à un niveau supérieur au tractus génital de la ponette. En manipulant le clamp de la sonde, celle-ci est remplie de liquide de collecte (RL). Après lubrification de l'embout de la sonde, on procède à un cathétérisme stérile du col. Après avoir insufflé 50 ml d'air dans le ballonnet collé contre la partie interne du col, on vide la poche de 500 ml puis on procède à un massage de l'utérus par voie rectale. On récolte le liquide en abaissant la poche tout en la retournant. Après échange avec la seconde poche, le même processus est répété. Pour la troisième poche, aucun massage n'est effectué. Après avoir attendu 5 minutes, on récupérera bien dans la troisième poche l'ensemble du liquide ayant baigné l'utérus c'est-à-dire en incluant celui qui reste dans la sonde après avoir abaissé la poche. Après avoir dégonflé le ballonnet, la sonde est retirée et lavée.

3.2.4 Préparation de l'embryon : recherche et lavage

Le contenu des trois poches de RL est passé sur un filtre de 67 µm (IMV, L'aigle) selon la Figure 3.

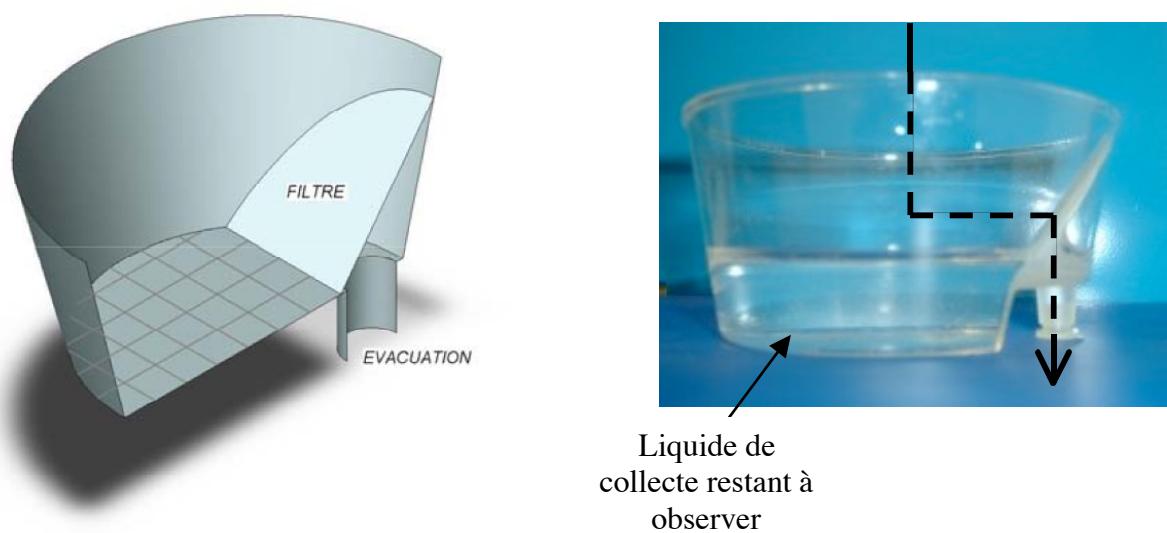


Figure 3 : schéma et photographie du filtrage du liquide de collecte embryonnaire

Sous hotte à flux laminaire, on transfère le contenu restant dans le filtre dans une boîte de Pétri quadrillée où l'on recherche l'embryon au grossissement 10 ou 12 à la loupe binoculaire.

L'embryon trouvé est ensuite lavé successivement dans 10 bains de 1ml de F1 (milieu tamponné au phosphate avec 4 g/l de BSA -Bovine Serum Albumin-, antibiotiques et antifongiques), répartis dans 10 trous de boîtes quatre trous.

3.3 La congélation

3.3.1 Groupes expérimentaux et incorporation du cryoprotecteur

Deux lots sont distingués selon la méthode d'incorporation du glycérol (Sigma G 2025), avant la congélation stricte :

- Lot témoin ($n_{final}=19$): l'embryon est passé successivement dans des bains de glycérol à 2,5% (5min), 5% (5min), 7,5% (5min) et 10% (10min).
- Lot direct ($n_{final}=19$): l'embryon est placé directement dans un puit contenant 1ml de glycérol 10% dans lequel il reste 25 minutes.

Les embryons des deux lots restent donc dans un milieu cryoprotecteur pendant une durée équivalente mais à des concentrations différentes.

Les embryons collectés sont attribués au fur et à mesure à chaque lot, en essayant d'avoir des lots avec des embryons de tailles homogènes.

Préalablement à l'incorporation du cryoprotecteur, les milieux sont préparés à l'aide d'un milieu de base F1 (IMV, L'aigle) auquel on ajoute de la glutamine (Sigma G 3126) à 0,1M (Lagneaux *et al.*, 2000). On prépare avec cette solution de base une solution à 10% de glycérol dont on déduit les autres solutions. Un osmomètre permet d'ajuster les pressions osmotiques de chaque solution afin d'obtenir une croissance graduelle (Annexe 1).

Tableau 1 : récapitulatif des durées d'incorporation du glycérol de chaque lot expérimental selon les concentrations en glycérol

Durée \ Lot	5 min	5 min	5 min	5 min	5min
Témoin	2,5%	5%	7,5%	10%	10%
Direct	10%	10%	10%	10%	10%

3.3.2 Montage de l'embryon dans une paillette

A la fin du dernier bain de cryoprotecteur, l'embryon est montée sous loupe binoculaire dans une paillette de 0,25 ml (IMV super cristal) afin qu'il ait une position centrale (Figure 4). Les paillettes sont préalablement identifiées selon le lot, la donneuse et la date.

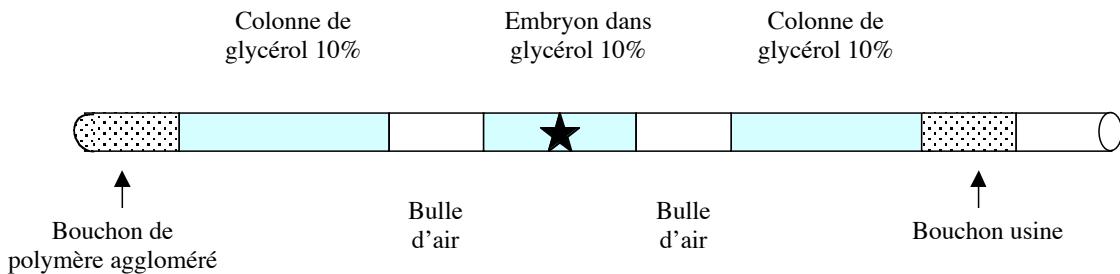


Figure 4: organisation d'une paillette de congélation après montage de l'embryon

3.3.3 Le processus de congélation stricte

C'est une congélation lente qui est pratiquée quel que soit le lot. On débute le refroidissement dans un congélateur programmable en descendant de 3°C/min jusqu'à -7°C. On réalise alors le « seeding » (induction de la cristallisation) manuellement, en appliquant une tige métallique, préalablement plongée dans de l'azote liquide, à chaque extrémité des paillettes rangées sur une rampe. Après avoir attendu la stabilisation à -7°C (environ 15min), le programme « postseeding » est lancé avec une descente de 0,3°C/min jusqu'à -30°C. C'est à cette température que l'on plonge la rampe contenant les paillettes dans l'azote liquide à -196°.

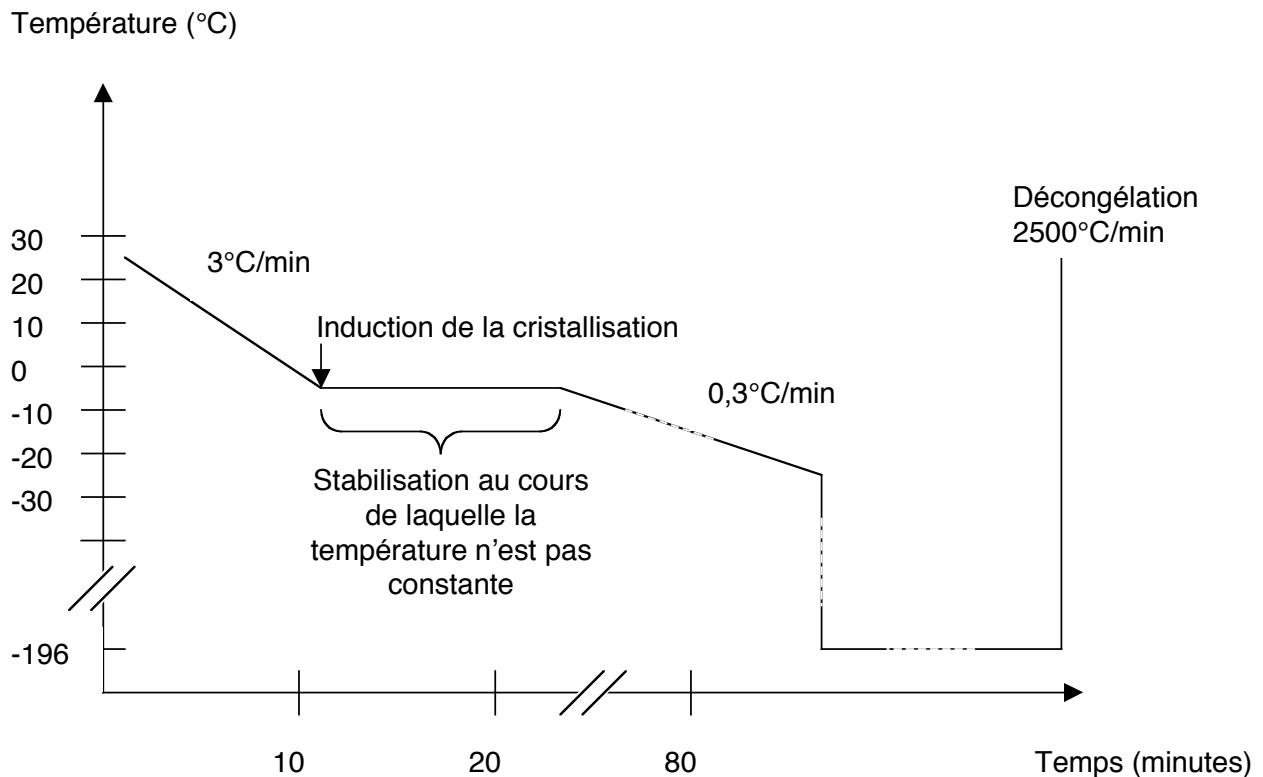


Figure 5: courbe de refroidissement en congélation lente

Le tableau suivant récapitule les différentes étapes auxquelles sont soumis les deux lots expérimentaux.

Tableau 2 : traitements des lots expérimentaux

Lot	Ajout du cryoprotecteur	Congélation	Décongélation	Retrait du cryoprotecteur
Témoin (TEM)	Glycérol 25 min (2,5%, 5%, 7,5%, 10%)	<u>+37°C → -7°C</u> 3°C/min, seeding <u>-7°C → -30°C</u> 0,3°C/min	+37°C, bain marie 30 sec	Glycérol (7,5%, 5%, 2,5%, 0%, 0%) et Sucrose (0,25M, 0,1M, 0,1M, 0M, 0M) 25 min
Direct (DIR)	Glycérol 25 min (10%)	<u>-30°C → -196°C</u>		

3.3.4 Répartition des paillettes dans le canister d'azote liquide

Après le processus de congélation, les paillettes sont transférées dans les visotubes. Chaque visotube est divisé en deux compartiments. Un embryon de chaque lot est transféré par compartiment ; les paires de paillettes sont réalisées en couplant des embryons de pères et de mères différents mais de tailles similaires. Cet appariement que l'on conserve au cours du transfert chirurgical permet de réaliser des tests de filiation après transfert avec plus de précision.

On stocke ensuite le tout dans des cuves d'azote.

3.4 Le transfert dans les receveuses

3.4.1 Décongélation

La décongélation se fait dans un bain marie à 37°C pendant 30 secondes. Le cryoprotecteur est retiré de l'embryon par des passages successifs dans des bains en concentrations décroissantes en glycérol.

3.4.2 Transfert chirurgical

On procède premièrement à une laparotomie par le flanc. Les receveuses sont mises à la barre et tranquillisées avec de l'acépromazine (0,04 mg/kg), de la détomidine (0,01 mg/kg) et du butorphanol (0,03 mg/kg). La fosse paralombaire est tondue et nettoyée chirurgicalement sur 35 cm de large et 45 cm de long. Une anesthésie locale linéaire est réalisée avec 60 ml de lidocaïne puis la peau est incisée au bistouri. L'incision se situe entre la

dernière côte et la pointe de la hanche, sur une longueur de 15 à 20 cm en débutant 10 cm ventralement aux processus lombaires. Les muscles oblique externe, transverse et oblique interne subissent une dissection mousse puis le péritoine est perforé à l'aide d'une pince à viscère maintenue fermée.

Ensuite, la corne utérine est extériorisée dans son premier tiers et ponctionnée jusqu'à sa lumière. On choisit pour cette ponction un site peu vascularisé. C'est au niveau de cette ouverture que l'on introduit une paillette rigide de 0,25 ml montée sur une seringue de 1 ml, et dans laquelle l'embryon a été préalablement aspiré dans son dernier milieu de retrait du cryoprotecteur (F1). On dépose ainsi l'embryon et l'on remet la corne en place.

Pour finir, les plans musculaires sont suturés et la chirurgie se termine par un surjet sous-cutané puis cutané. La plaie séchée est couverte par un pansement. Des soins postopératoires habituels sont mis en place.

3.5 *Suivi du transfert embryonnaire*

3.5.1 Diagnostic de gestation

Un examen échographique est réalisé 5 jours après le transfert chirurgical soit à J11 post ovulation. On recherche le développement d'une ou de deux vésicules embryonnaires avec une sonde échographique de 5 MHz. À ce stade, on remarque souvent la vésicule embryonnaire en observant deux traits échogènes à son pôle ventral et son pôle dorsal (sans signification structurelle précise). A 11 jours, l'embryon fera une taille de moins de 1 cm (McKinnon, 1993).

3.5.2 Collecte embryonnaire

A J11 (âge de l'embryon), en procédant de façon identique à la collecte de la donneuse, la receveuse est collectée après avoir été échographiée. Il est possible d'arrêter la collecte à la fin de la poche de Ringer lactate utilisée si on voit passer l'embryon.

Dans le cas d'une collecte complète (deux embryons), on note un diagnostic positif pour tous les embryons que l'on a transférés dans la receveuse concernée (lot témoin et lot direct)(Tableau 3). Si un seul embryon est collecté, il est transféré dans un minimum de milieu dans un tube eppendorf, stocké à - 20°C en attente d'un test de filiation.

Les ponettes dont une endométrite est détectée sont traitées et leurs embryons sont écartés de la manipulation.

Tableau 3 : gestion des embryons après collecte de la receveuse

Collecte de la receveuse	Traitement des embryons	Diagnostic de gestation
Totale	Aucun	Positif pour les deux lots
Partielle	Test de filiation	Positif pour les embryons identifiés

3.5.3 Test de filiation

Les embryons issus d'une collecte partielle sont soumis à un test de filiation afin de retrouver le couple de parents correspondant. Ces couples de parents étant différents entre les lots témoin et direct, cela permet de définir si l'embryon qui a été viable après transfert a été congelé avec une méthode d'ajout direct de glycérol ou d'ajout progressif.

Ce test de filiation est réalisé par le laboratoire LABOGENA à Jouy-en-josas. Il repose sur l'identification des embryons au moyen de marqueurs microsatellites par PCR (polymerase chain reaction)(Guérard *et al.*, 1997). Les « cartes d'identité génétique » des embryons sont comparées à celles des parents, préalablement typés sur prise de sang. On donne le résultat sous forme de degré de compatibilité génétique.

3.5.4 Evaluation des embryons

3.5.4.1 Stade de développement

Bien que les embryons soient tous collectés à J6 (6 jours après ovulation constatée), leur stade de développement peut être différent et est donc évalué. On essaie de repérer éventuellement des ovocytes non fécondés qui pourraient être présents dans les cornes utérines dans 3% des cas (Squires, 1982) afin de ne pas les traiter. La classification suivante est dérivée d'une classification bovine (Merton, 2002). Les stades sont décrits dans l'ordre chronologique de leur développement dans la cavité utérine et cela jusqu'à une limite extrême du jour de collecte :

- *Morula, 5^{ième}-6^{ième} jours post ovulation :*

Zone pellucide (ZP) épaisse, blastomères plus ou moins condensés.

- *Jeune blastocyste, 6^{ième}-7^{ième} jours :*

Diminution de la ZP, apparition de la capsule entre la ZP et le trophoblaste, blastocoèle présent (<50% du volume de l'embryon).

- *Blastocyste :*

Blastocoèle >50%, masse cellulaire interne et trophoblaste bien discernables.

- *Blastocyste épanoui, 7^{ième}-8^{ième}-9^{ième} jours :*

Disparition de la ZP, capsule intacte, augmentation de diamètre.

- *Blastocyste éclos :*

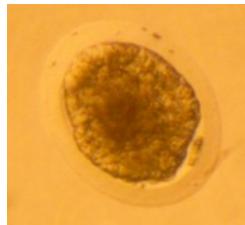
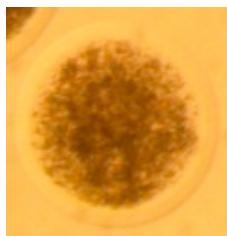
Forte augmentation de taille.

3.5.4.2 Evaluation qualitative

Une classification qualitative est également réalisée selon les critères suivants: la compaction des blastomères, l'expulsion des blastomères dans l'espace périvitellin, la couleur

de l'embryon, la forme générale de l'embryon, les altérations de la zone pellucide et de la capsule et la proportion de l'espace périvitellin occupé par la masse embryonnaire (Slade, 1985 ; Squires, 1995). Les variations notées sont dues soit à l'ajout du cryoprotecteur soit à la congélation/décongélation.

Tableau 4 : classification qualitative des embryons équins

Embryons	Grade	Qualité	Commentaires
	1	Excellent	Embryon idéal, sphérique, cellules de taille, couleur et texture uniformes
	2	Bon	Imperfections légères : quelques blastomères expulsés, forme de l'embryon irrégulière, séparation du trophoblaste
	3	Correct	Problèmes bien définis mais peu sévères : blastomères expulsés, cellules dégénérées, ou blastocoele collabé (embryon contracté)
	4	Médiocre	Problèmes sévères : blastocoele collabé, nombreux blastomères expulsés, cellules dégénérées mais masse embryonnaire apparemment viable
	5	Mauvais	Oocyte non fécondé ou embryon dégénéré

3.5.4.3 Diamètres

Le dernier critère que l'on observe également au grossissement 90 à la loupe binoculaire est le diamètre. Le diamètre interne (embryon sans la zone pellucide et la capsule) et le diamètre externe sont appréciés à l'aide de graduations intégrées dans le système optique de la loupe (Figure 6). On traduit ensuite ces diamètres par des volumes dont on étudie les variations comme reflet des flux osmotiques au cours des différentes phases de la cryoconservation. Ce sont des volumes relatifs aux volumes initiaux de chaque embryon qui sont comparés puisque aucun embryon n'a la même taille à la collecte.

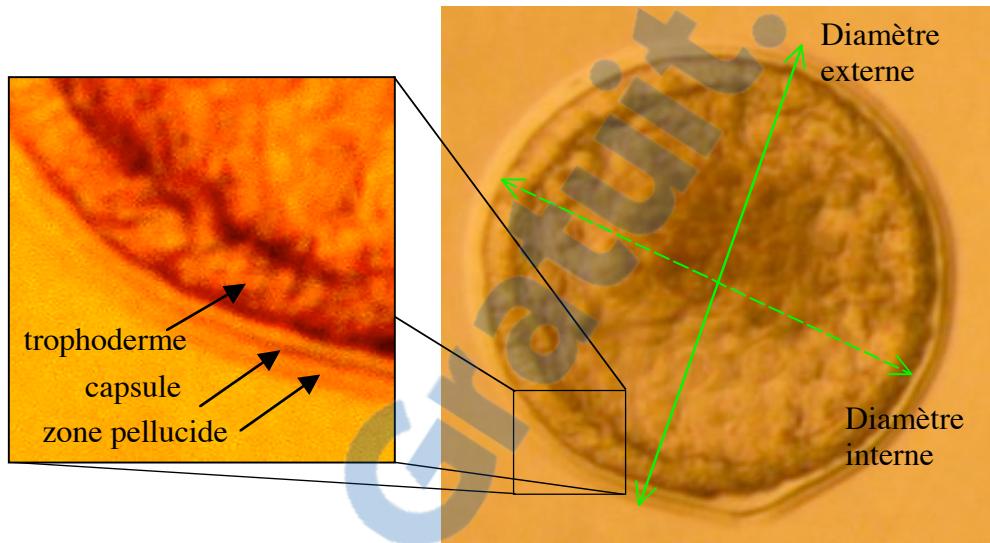


Figure 6: diamètres à évaluer au cours de l'expérimentation

Tableau 5: types d'évaluation de l'embryon au cours des étapes de l'expérimentation

ETAPE	Lavage	Ajout du cryoprotecteur	Décongélation	Retrait du cryoprotecteur
	→ dans le 10 ^{ème} bain de lavage	→ dans le dernier bain de glycérol 10%	→ après vidange de la paillette	→ dans le dernier bain de F1
EVALUATIONS	STADE GRADE DIAMETRES PHOTO	GRADE DIAMETRES PHOTO	GRADE DIAMETRES PHOTO	GRADE DIAMETRES PHOTO

3.6 Analyse des résultats

Les données ont été analysées, en fonction des besoins et des conditions d’application, avec les tests suivants :

- Test de Student pour comparer les deux lots pour une étape donnée
- Test de Student apparié pour comparer deux étapes successives pour un lot
- Test du χ^2 pour étudier l’éventuel lien entre le résultat du diagnostic de gestation et le score morphologique après décongélation et retrait du cryoprotecteur
- Test de Mc Nemar pour comparer les résultats de diagnostic de gestation entre les deux lots.

4 RESULTATS

4.1 Bilan de la collecte des donneuses

Le diamètre externe des embryons à la collecte variait de 155,6 µm à 311,1 µm (Tableau 6). Le lot témoin comprenait 26 embryons à la congélation et le lot avec incorporation directe du glycérol en comprenait 27. Mais en considérant les juments qui ont eu des endométrites après transfert et des transferts non conformes, il ne reste plus *a posteriori* que 19 embryons pour le lot témoin et 19 embryons pour le lot direct.

Tableau 6: diamètre externe des embryons de chaque lot à la collecte

Taille (µm)	Lot témoin (n=19)	Lot direct (n=19)
Minimale	166,7	155,6
Maximale	311,1	255,6
Moyenne ± s.e.m.	207,6 ± 8,7	198,5 ± 7,6

Le taux de collecte des donneuses s'élève à 56%.

4.2 Perte et élimination des embryons au cours de l'étude

Tableau 7: nombre d'embryons au cours des étapes de l'expérience

Nombre d'embryons collectés	Nombre d'embryons congelés	Nombre d'embryons transférés	Nombre d'embryons collectés chez les receveuses	Nombre de diagnostics de gestation positifs
59	53	48	21	9

Un nombre inférieur d'embryons a été congelé par rapport à la collecte (Tableau 7) car les embryons d'un grade morphologique trop élevé ont été exclus. Ces embryons présentaient déjà des signes de dégénérescence (contraction, déformation, cellules exclues) qui ne permettaient pas de juger les variations morphologiques dues ensuite uniquement à la congélation-décongélation. Un des embryons a été éliminé suite à un accident lors de la mise en paillette.

L'élimination avant le transfert concernait encore des embryons dégénérés. Un embryon fut exclu suite à une décongélation imprévue.

Les juments dont les embryons présentaient un développement suffisant (surtout en taille) et qui conservaient un assemblage cellulaire structuré et compact ont été considérées comme gravides. Ceux qui n'avaient pas évolué depuis la mise en place chirurgicale ou ceux qui étaient dégénérés ont été éliminés.

4.3 Etude des variations du volume externe

Quel que soit l'embryon (Figure 7, Figure 8) et quel que soit le lot (Figure 9), le volume relatif externe varie peu au cours des étapes de l'expérience. Le volume externe reste toujours proche de sa valeur initiale. Le diamètre variant peu, les enveloppes subissent donc peu de contraintes.

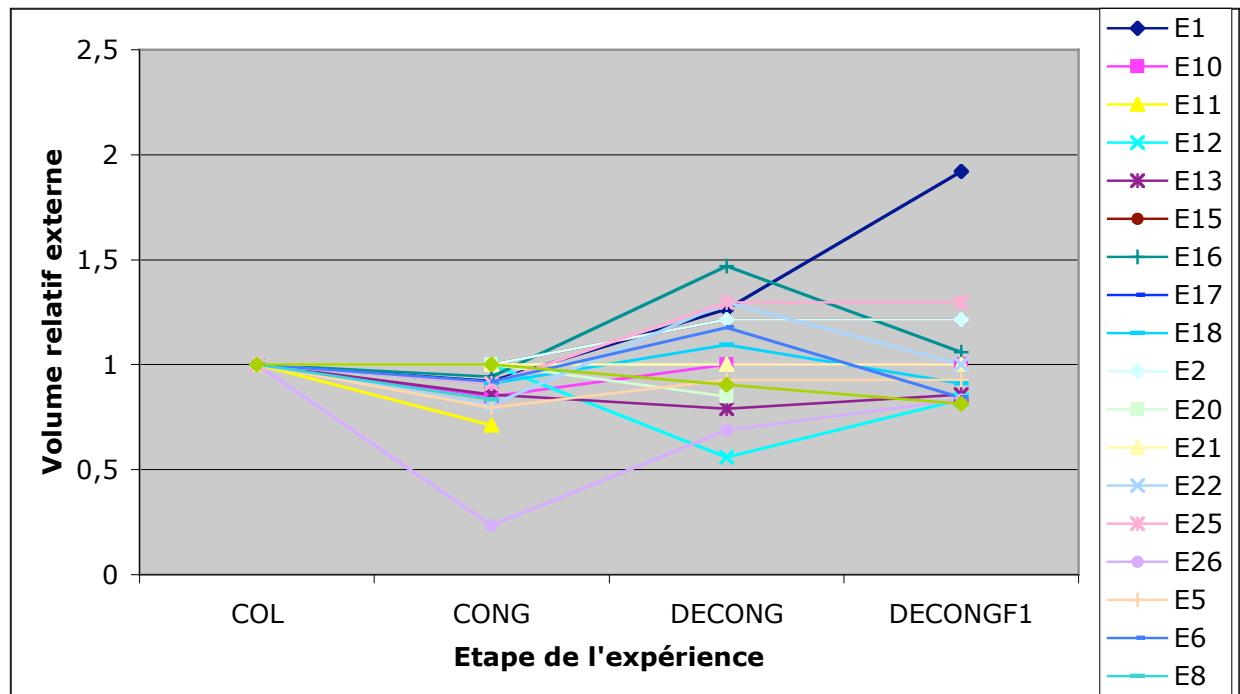


Figure 7: évolution des volumes relatifs externes des embryons du lot témoin au cours de l'expérience

Légende :

- COL : étape directement après la collecte
- CONG : étape après ajout du cryoprotecteur, juste avant la congélation
- DECONG : étape directement après le cycle de décongélation
- DECONGF1 : étape après retrait du cryoprotecteur
- Ex : embryon x .

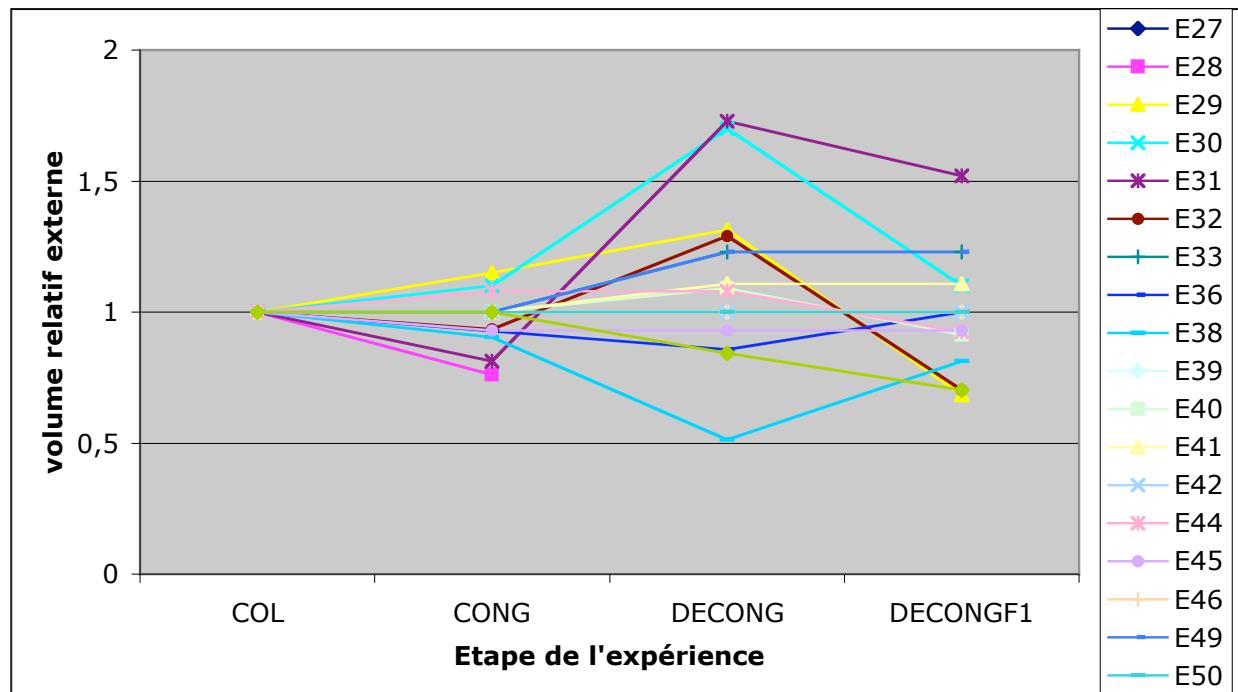


Figure 8: évolution des volumes relatifs externes des embryons du lot direct au cours de l'expérience

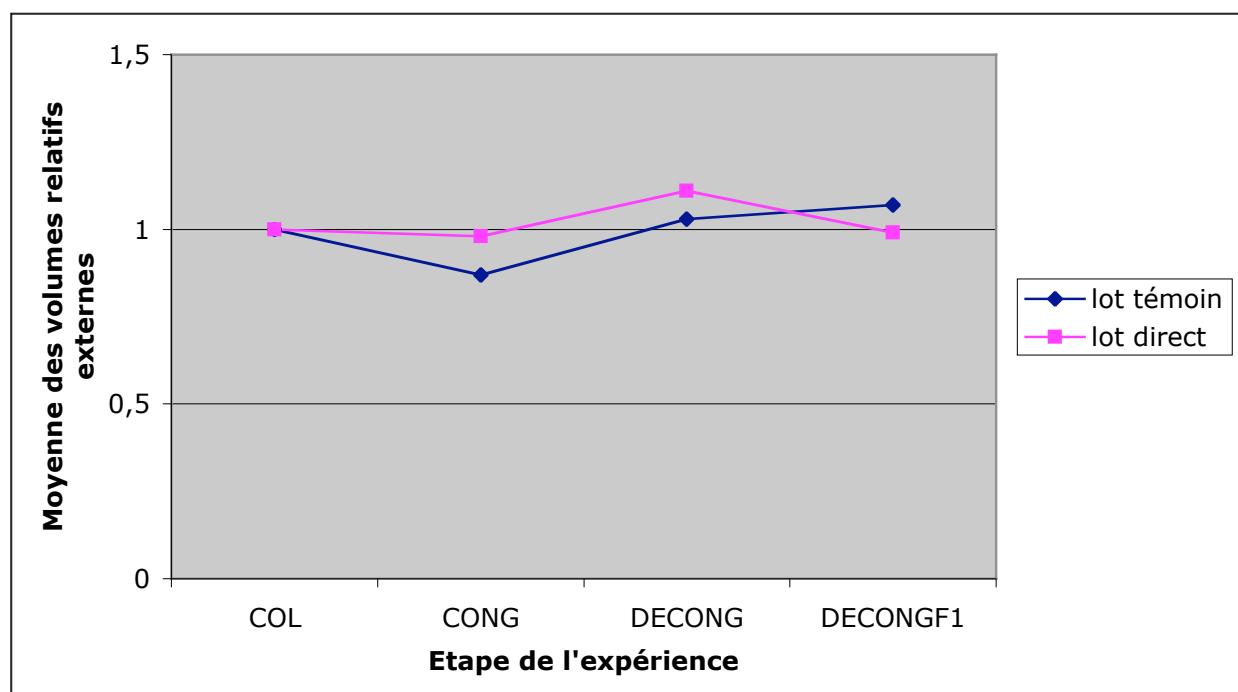


Figure 9: évolution des moyennes des volumes relatifs externes pour chaque lot au cours de l'expérience

4.4 Etude des variations du volume interne

Quel que soit l'embryon, le volume interne a tendance à subir le même type de variation (Figure 10, Figure 11):

- à l'ajout du cryoprotecteur, le volume interne diminue significativement (test de Student apparié, $p<0,01$)
- à la décongélation, les embryons regrossissent significativement ($p<0,01$)

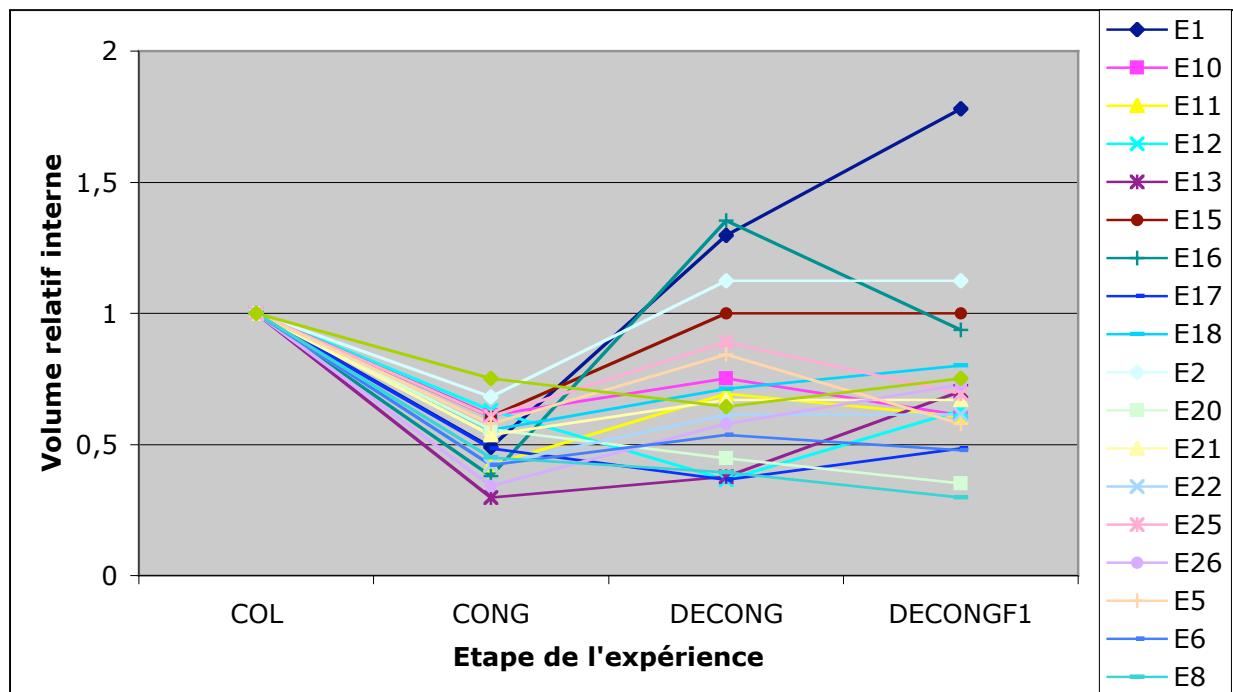


Figure 10: évolution des volumes relatifs internes des embryons du lot témoin au cours de l'expérience

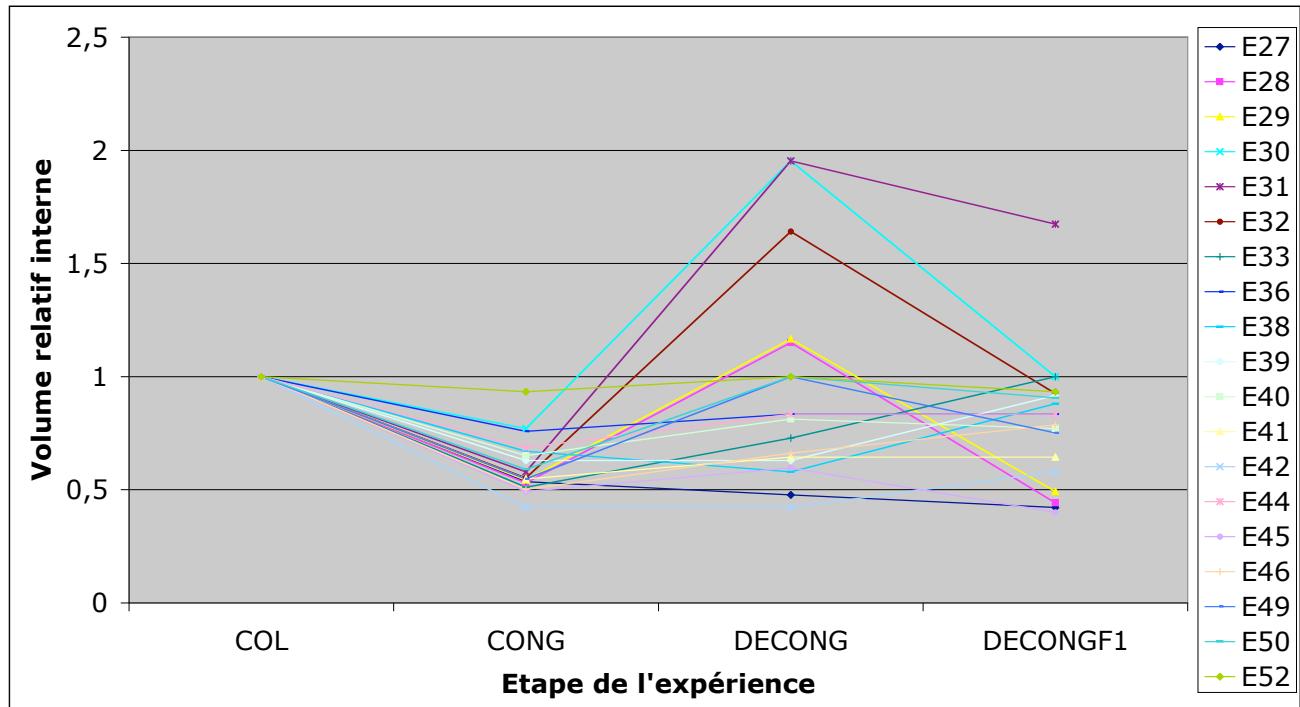


Figure 11: évolution des volumes relatifs internes des embryons du lot direct au cours de l'expérience

Le volume relatif interne varie de façon identique dans les deux lots (Figure 12).

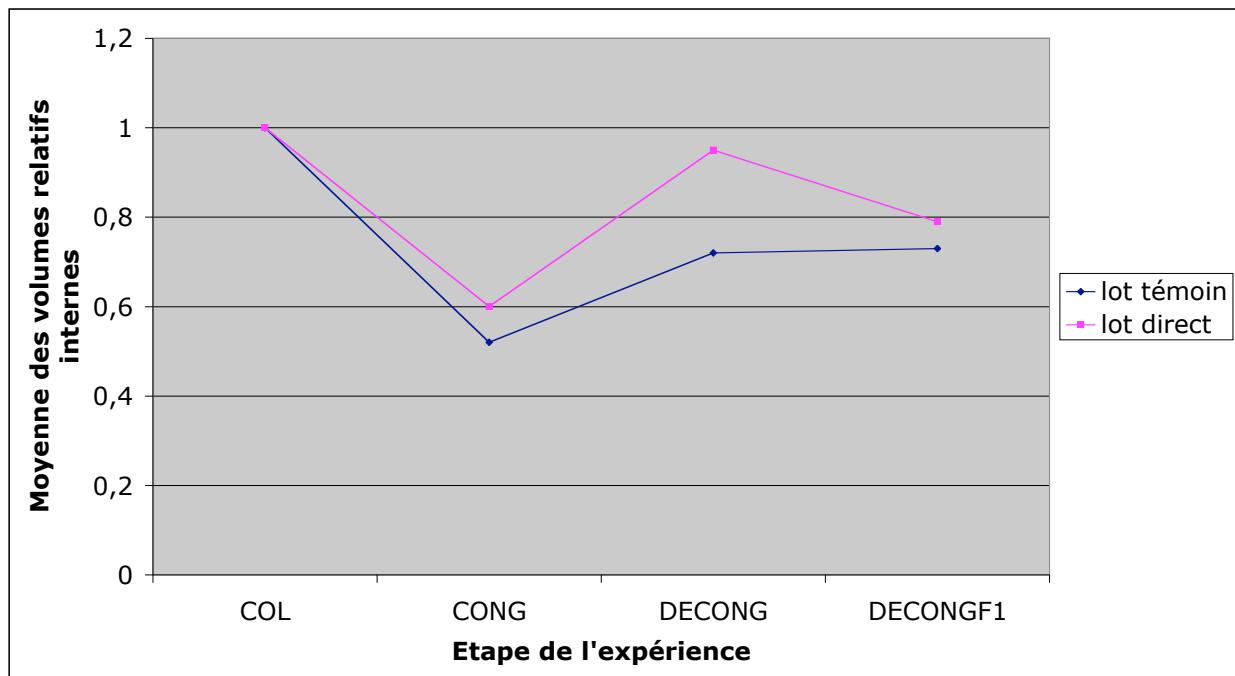


Figure 12: évolution des moyennes des volumes relatifs internes pour chaque lot au cours de l'expérience

4.5 Etude de l'évolution des notes morphologiques

Les notes morphologiques ont tendance à croître au cours de l'expérience avec une forte augmentation à l'ajout du cryoprotecteur (Figure 13, Figure 14).

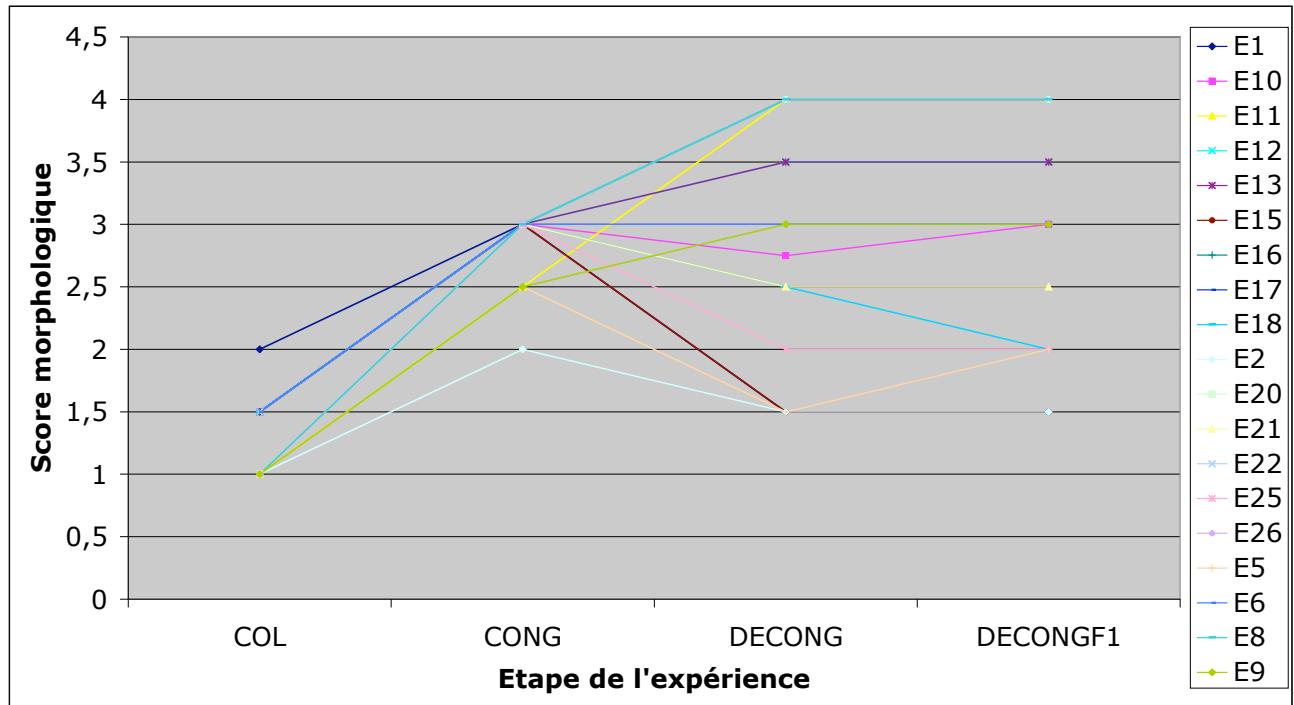


Figure 13: évolution des notes morphologiques pour les embryons du lot témoin au cours de l'expérience

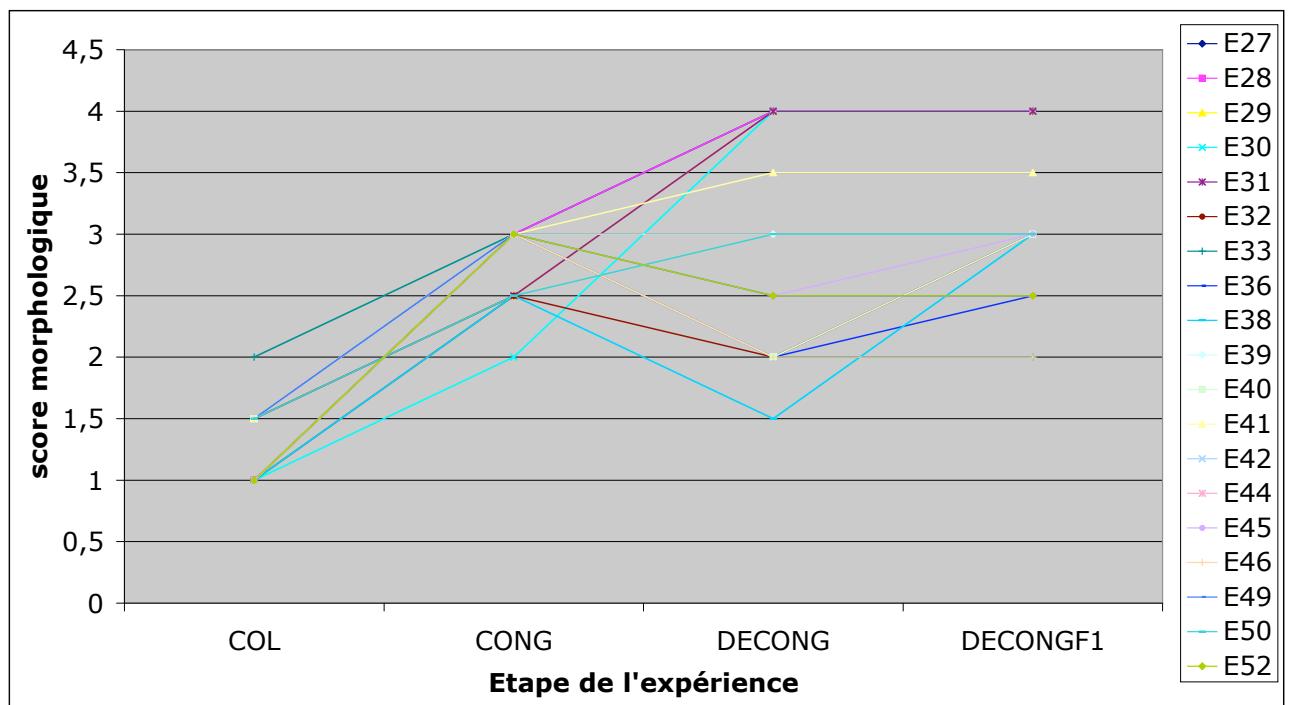


Figure 14: évolution des notes morphologiques des embryons du lot direct au cours de l'expérience

Aucune différence significative (test de Student, $p>0,05$) n'est relevée entre les scores des deux lots à chaque étapes (Figure 15). La technique d'ajout direct du cryoprotecteur ne semble pas agir différemment sur l'aspect morphologique de l'embryon et en particulier ne le détériore pas.

Il existe des différences significatives (test de Student apparié, $p<0,01$) de score entre l'étape de collecte (COL) et après l'ajout de cryoprotecteur (CONG) ainsi qu'entre l'étape avant congélation (CONG) et l'étape après congélation (DECONG).

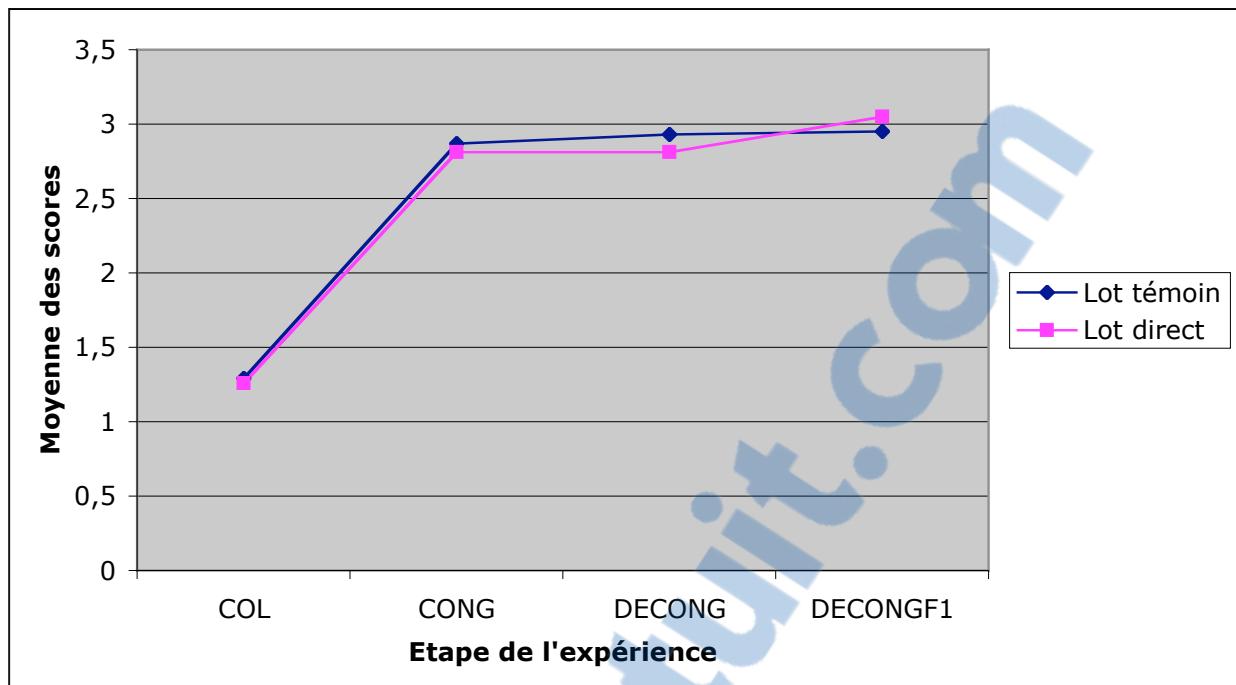


Figure 15: évolution des moyennes des notes morphologiques pour chaque lot au cours de l'expérience

4.6 Etude des taux de gestation

Tableau 8: bilan de l'évaluation des embryons collectés chez les receveuses

Receveuse	Diamètre (μm) interne à la mise en place	Score avant mise en place	Diamètre (μm) 2 ^{ème} collecte	Résultats 2 ^{ème} collecte au microscope	DG positif	DG positif selon le lot
W574	Dir 133 Tém 144	1,5 4	4500	1 OK	1	1 tem 0 dir
W578	Dir 177 Tém 167	4 2	320 ; 3830	1 OK, 1 DGN	1	1 tem 0 dir
W577	Dir 167 Tém 139	4 3	200 ; 600	2 DGN	0	0 dir 0 tem
W522	Dir 211 Tém 255	3 4	2500	1 DGN	0	0 dir 0 tem
W535	Dir 111 Dir 111 Tém 158	2 4 3	980	1 DGN	0	0 dir 0 tem

Receveuse	Diamètre (μm) interne à la mise en place	Score avant mise en place	Diamètre (μm) 2 ^{ème} collecte	Résultats 2 ^{ème} collecte au microscope	DG positif	DG positif selon le lot
W544	Dir 177 Tém 155	2,5 3	5600 ; 6500	2 OK	2	<u>1 dir</u> 1 tem
W563	Dir 128 Tém 133	3 3,5	605 ; 722	2 DGN	0	0 dir 0 tem
W582	Dir 200 Tém 200	2,5 1,5	812	1 DGN (endométrite)	ND	ND
W567	Dir 105 Tém 155	3,5 2,5	705	1 DGN	0	0 dir 0 tem
W430	Dir 200 Tém 144	2 2	4500 ; 500	1 OK, 1 DGN	1	1 tem 0 dir
W564	Dir 166 Tém 150	3 3	3000	1 OK	1	<u>1 dir</u> 0 tem
W553	Dir 155 Tém 188	2,5 4	2250	1 irrégulier	1	<u>1 dir</u> 0 tem
W516	Dir 122 Tém 122	2,5 4	440 ; 722	1 DGN, 1 irrégulier et 2 autres structures (endométrite)	ND	ND
W453	Dir 111 Tém 127	2,5 2	6400 ; 5600	2 OK	2	<u>1 dir</u> 1 tem

Légende :

Dir: signifie que l'embryon appartient au lot d'ajout direct du cryoprotecteur.

Tem : signifie que l'embryon appartient au lot d'ajout progressif du cryoprotecteur.

DGN : signifie embryon dégénéré (déformé, ayant perdu beaucoup de cellules...).

ND (Non Disponible) : dans la colonne des diagnostics de gestation positifs exclut cet embryon du décompte car la jument receveuse présentait une endométrite.

Les tailles des embryons à la deuxième collecte ne sont pas attribuées à un embryon d'un lot car on ne peut les différencier.

La dernière colonne est complétée grâce aux résultats de filiation de Labogena.

Une gestation est considérée positive à J11 si les critères suivants sont observés :

- Présence d'une structure embryonnaire à l'échographie ou sous microscope à la recollecte
- Taille suffisante qui résulte d'un développement depuis la remise en place
- Structure embryonnaire peu altérée (structure unique, peu désagrégée avec des cellules compactes).

On obtient ainsi 9 diagnostics de gestation positifs à J11 (Tableau 8).

Le taux global de gestation est de 9/38 soit 24% (38 = total des embryons transférés - nombre d'embryons transférés avec endométrite (8) et nombre d'embryons transférés par voie cervicale (2)).

Les embryons transférés dans les receveuses W539, W582, W516 et W546 sont exclus de la manipulation pour les résultats. En effet, on a dépisté une endométrite chez ces ponettes à la deuxième collecte, soit par la présence d'un liquide abondant à l'échographe soit par l'aspect anormal du liquide utérin à la deuxième collecte. L'échec d'une gestation pouvant être alors soit intrinsèque à l'embryon soit secondaire à l'endométrite, nous avons préféré écarter les embryons transférés dans ces receveuses.

4.7 Taux de gestation comparés entre les lots témoin et direct

On exploite ici uniquement les 38 embryons dont les juments n'ont pas eu d'endométrite et dont le transfert s'est fait par chirurgie. Le tableau suivant résume les résultats pour chaque lot (n=19 par lot).

Tableau 9: résultats définitifs à la deuxième collecte

Etat de l'embryon	Lot témoin (n=19)	Lot direct (n=19)
Diagnostic de gestation positif	5	4
Dégénéré	5	4
Non recollecté	9	11

Le taux de gestation à J11 du lot témoin est de 26,32 % contre 21,05% pour le lot direct.

Le développement *in vivo* semble similaire pour les deux lots, même si le test de Mc Nemar ne permet pas de le confirmer. La taille de l'échantillon n'est pas suffisante pour appliquer le test de Mc Nemar.



Le lot direct ne semble apporter aucun bénéfice au lot témoin contrairement à la tendance annoncée par l'expérience *in vitro* (Allard, 2004). On remarque que les résultats du lot direct ne sont pas moins bons que ceux du lot témoin.

4.8 Corrélation de la note morphologique à la décongélation et de la viabilité *in vivo* (*diagnostic de gestation positif à J11*)

Le lien entre les diagnostics de gestation à J11 (âge de l'embryon) et les scores morphologiques de ces mêmes embryons notés à la décongélation après retrait du cryoprotecteur a été étudié par un test du χ^2 .

Les distributions des deux critères sont indépendantes ($p>0,05$). Le score morphologique n'est pas lié au résultat du diagnostic de gestation.

5 DISCUSSION

5.1 Collecte des embryons

Le taux de collecte de notre étude s'élève à 56% pour des embryons de 6,75 jours. Les facteurs de variation du taux de collecte sont les suivants (McKinnon, 1999 ; Squires *et al.*, 2003) :

- Le technicien
- Le jour de collecte : à J6 après fécondation, le taux de collecte est inférieur à ceux de J7, J8 et J9. Comme il a été vu en partie introductory, il existe également une différence plus précise pour les collectes précoce. Lagneaux *et al.* (1991) obtiennent respectivement pour des collectes à J6, J6,25 et J6,75 des taux de collecte de 61%, 60% et 100%
- Le nombre d'ovulation : les doubles ovulations spontanées semblent améliorer le taux de collecte
- L'âge et le passé de reproduction de la donneuse
- La qualité de la semence : les inséminations en sperme frais semblent donner de meilleurs résultats
- La saison : les taux de collecte sont en général plus faibles soit tôt dans la saison de monte soit tard dans la saison de monte.

Notre expérience ayant été réalisée par les mêmes manipulateurs, sur une grande période de la saison de reproduction, avec du sperme frais, et un panel important de ponettes, un certain nombre des facteurs cités ci-dessus sont contrôlés. Concernant le jour de collecte, travailler à J6,75 permettait d'avoir des embryons relativement jeunes sans trop réduire le taux de collecte.

Cependant, il faut encore optimiser cette collecte. En effet, son taux peut décroître du fait de la difficulté de reconnaître un embryon de petite taille à la loupe binoculaire ; un effort de recherche est donc nécessaire. L'embryon peut encore se perdre lors des manipulations de collecte ; il faut bien veiller à vider le contenu de la sonde dans les poches de collectes et vider ces poches avec un bon flux sortant afin de ne pas laisser l'embryon collé aux parois. Un problème de flux peut également exister au cours de l'aspiration du liquide contenu dans l'utérus de la ponette ; une discontinuité de flux est défavorable au succès de la collecte. En revanche, on ne peut lutter contre un défaut de passage de la jonction utéro-tubaire qui se réalise normalement entre J5 et J6 (Flood, 1993).

Face à ces facteurs de variation du taux de collecte, il faut rechercher à améliorer ce taux : les doubles ovulations sont une possibilité et choisir J6,75 plutôt que J6,25 ou J6 une autre.

Cependant, la congélation des embryons équins nécessite des embryons les plus jeunes (stade morula ou jeune blastocyste) (Slade *et al.*, 1985 ; Skidmore *et al.*, 1991) et les plus petits possibles (200 µm) (Lagneaux *et al.*, 1991). Quelle que soit la méthode de cryoconservation, les gros embryons ne semblent pas supporter la congélation. Les efforts

doivent se concentrer à améliorer les techniques pour petits embryons tout en essayant de collecter au plus tôt. Pour obtenir des embryons plus précoces, il a été envisager de précipiter la descente dans l'oviducte avant une collecte normale (Flood, 1993). Un traitement testé a été l'injection de prostaglandines dans l'oviducte, afin d'augmenter la contraction du myosalpinx.

Si les techniques de congélation sont limitées par la taille des embryons, il est dans notre intérêt de rechercher à avoir des embryons de plus en plus précoce. La collecte, sans faire partie intégrante du cycle de congélation/décongélation, doit être prise en compte pour améliorer la cryopréservation.

5.2 Le choix du transfert chirurgical

5.2.1 Choix d'un transfert chirurgical sur les ponettes

Lagneaux *et al.* (1989) ont montré que les ponettes et les juments réagissaient différemment au transfert cervical d'embryon. La manipulation du col plus étroit des ponettes entraîne une décharge de PGF_{2α} plus facilement et l'on note une lutéolyse précoce chez les ponettes gravides. Au bilan, le taux de gestation des ponettes était plus faible que celui des juments type Selle Français. Notre choix s'est donc orienté vers un transfert chirurgical qui semble, en moyenne, donner de meilleurs résultats (Imel *et al.*, 1981; Carnevale *et al.*, 2000). Le transfert chirurgical évite les inconvénients du transfert non chirurgical qui sont la réponse inflammatoire de l'endomètre, la contraction de l'utérus et le rejet de l'embryon, le traumatisme par la pipette, les variations de site de dépôt dans l'utérus et l'effet manipulateur (Lagneaux *et al.*, 1989).

Ce transfert peut paraître relativement traumatisant pour l'animal et fastidieux pour le chirurgien. Cependant, la laparotomie par le flanc n'exige pas de couper l'animal. Les risques de l'anesthésie générale sont donc écartés. Un chirurgien expérimenté pratique cela rapidement (moins d'une heure), dans un simple travail. La douleur éventuelle suite à la manipulation de l'utérus justifie l'emploi d'un dérivé morphinique (butorphanol) comme analgésique.

5.2.2 Choix d'un transfert multiple

Pour ce transfert chirurgical, nous avons choisi de mettre en place plusieurs embryons dans l'utérus d'une même jument. Cela a pour intérêt de minimiser l'effet receveuse ainsi que l'effet transfert (manipulateur...). Nous pouvons alors mieux juger de l'efficacité du protocole de congélation de l'embryon puisque c'est le seul facteur qui changera entre les embryons d'un couple transféré. En effet, les facteurs affectant les taux de gestation et la mortalité embryonnaire précoce sont la receveuse (qualité du tractus génital, âge...), la technique de transfert embryonnaire et la qualité de l'embryon transféré (résultant du protocole de congélation)(Carnevale *et al.*, 2000).

Un autre avantage de ce transfert multiple est un avantage pratique et éthique dans le cadre du milieu de la recherche. En transférant plusieurs embryons, le nombre de chirurgie est alors diminué. Cela permet de ne pas se restreindre sur le nombre d'individus à étudier dans

les groupes expérimentaux. Ce nombre est en effet déjà limité par l'inefficacité des traitements de superovulation (McKinnon, 1999).

Face à ses avantages théoriques, quelques équipes ont déjà utilisé avec succès ce type de transfert. Lagneaux *et al.* (2000) ont testé trois concentrations de glutamine dans la solution de cryoprotection en transférant trois embryons par receveuse par voie cervicale. Une receveuse sur dix a présenté une double gestation à J14 et neuf receveuses ont présenté des simples gestations. Carraciola di Brienza *et al.* (2003) ont obtenu trois vésicules à J16 sur trois embryons transférés non chirurgicalement.

Le transfert de plusieurs embryons repose premièrement sur le fait que les juments développent naturellement des gestations gémellaires. De plus, Camillo *et al.* (1997) ont montré qu'une jument peut porter son propre embryon et un embryon transféré simultanément. Ils obtiennent deux doubles gestations après avoir transféré des embryons sur des juments au préalable inséminées. Parmi les gestations simples certains embryons développés sont des embryons transférés. En outre, ils remarquent qu'il faut un certain degré de synchronisation entre le développement de l'embryon transféré et le stade de gestation de la receveuse.

Non seulement les vésicules embryonnaires ne se gênent pas dans leur développement, mais la présence d'une vésicule embryonnaire aurait un effet positif sur le développement d'autres vésicules. Ball *et al.* (1989) montrent que le transfert chirurgical d'une vésicule trophoblastique formée *in vitro* augmente la durée de la phase lutéale de la receveuse. Ce maintien de la phase lutéale est confirmé par l'augmentation de la concentration de progestérone et de l'intervalle interoestrus. Rajouter un embryon ou une structure embryonnaire type vésicule trophoblastique jouerait donc un rôle dans la reconnaissance maternelle de la gestation. C'est d'ailleurs pourquoi certains couples d'embryons dont l'un d'eux était dégénéré à la décongélation (grade morphologique de 4) ont été transférés, espérant que l'embryon dégénéré servirait à augmenter le signal embryonnaire.

Il se dégage de ces considérations que le transfert multiple présente un réel avantage dans le domaine de la recherche ainsi qu'une véritable efficacité. Une étude sur l'OPS d'embryons équins, réalisée en parallèle à notre étude, a obtenu des débuts de gestation de 3 embryons simultanément sur des transferts multiples de 4 embryons. On peut donc envisager de futures études avec plus de deux embryons transférés.

Cependant, l'évaluation des gestations issues de transferts multiples ne peut se faire que jusqu'à un certain stade de développement quand on considère les résorptions spontanées qui se produisent lors de gestations gémellaires. Ceci est un inconvénient à prendre en compte lors de l'utilisation du transfert multiple en étude expérimentale.

5.3 Le diagnostic de gestation à J11 : une évaluation *in vivo* de la cryopréservation des embryons

Sur 38 embryons transférés, la deuxième collecte a permis de récupérer 18 structures embryonnaires (47%). Cependant, le taux de gestation à J11 a été estimé à 24%. Les structures récoltées qui n'ont pas été prises en compte dans les diagnostics positifs

correspondent soit à des embryons qui ne présentent pas d'augmentation suffisante de taille soit à des embryons dégénérés (perte des enveloppes et dissociation cellulaire).

Il est à noter que lors d'une collecte, plus de deux structures ont été retrouvées. Les structures supplémentaires pourraient provenir du passage de la jonction utéro-tubaire d'ovocytes de la ponette receveuse. Le test de filiation voit donc son intérêt augmenté afin de ne pas confondre un embryon congelé réellement en développement et une structure intrinsèque à la receveuse.

En croisant le critère développement (augmentation de taille) et viabilité (embryon non dégénéré) le taux de gestation est relativement bas.

D'autres études de congélation lente ont également évalué l'efficacité de leur protocole par le développement embryonnaire après transfert. Des gestations à terme seraient l'idéal pour juger de cette efficacité. Mais dans le cadre expérimental, le nombre d'animaux étant souvent restreint, de nombreuses études mettent un terme précoce à la gestation. La date de ces avortements provoqués varie et on trouve ainsi des diagnostics échographiques de gestation à différents stades. Le 16^{ème} jour est couramment testé (Bass *et al.*, 2004 ; Czlonkowska *et al.*, 1985 ; Hochi *et al.*, 1996 ; Lagneaux *et al.*, 2000 ; Maclellan *et al.*, 2002). Certains auteurs ont aussi fait des échographies à 14 jours (Legrand *et al.*, 2000), 20 jours (Huhtinen *et al.*, 1997), 28 jours (Legrand *et al.*, 2002) ou 50 jours (Skidmore *et al.*, 1991) ; en intercalant le plus souvent des contrôles réguliers. Ceci a permis de montrer que certains embryons aperçus au départ pouvaient disparaître, ce qui pourrait remettre en question le diagnostic trop précoce pour juger de la viabilité à terme de l'embryon.

Les critères d'un diagnostic de gestation positif sont la visualisation d'une vésicule embryonnaire (répétée dans le cas de suivi à plusieurs dates), ou le battement cardiaque pour les diagnostics au-delà du 20^{ème} jour (Huhtinen *et al.*, 1997). Czlonkowska *et al.* (1985) ont rajouté d'autres critères comme le dosage de la progestérone plasmatique par exemple. Le résultat d'une collecte après transfert a été pris en compte par Lagneaux *et al.* (2000). C'est aussi une deuxième collecte qui nous a servi pour établir nos diagnostics de gestation.

Il est intéressant de revenir sur ce point pour discuter des critères de décision. Nous avons choisi de privilégier le critère « embryon non dégénéré » comme résultat positif. Il se trouve que tous ces embryons possédaient également une taille relativement importante (de l'ordre de 1 mm à plus). Mais si l'on considère le développement normal des embryons, la taille à 11 jours devrait être de l'ordre de 6 mm (McKinnon, 1993). Il est admis que les embryons après décongélation ont une croissance altérée, un développement ralenti. Pour que notre critère de développement soit plus objectif, il faudrait posséder une courbe des diamètres d'embryons cryopréservés après transfert en fonction de leur âge. On pourrait ainsi donner une croissance relative qui servirait de seuil pour accepter l'embryon comme s'étant développé. Quant à l'aspect dégénéré de certains embryons, on peut penser que la manipulation de la deuxième collecte peut avoir endommagé certains embryons. Dans ce cas-là, il faudrait croiser le facteur « dégénéré » avec la taille et accepter certains embryons de morphologies altérées mais de taille relativement importante. Cela pourrait augmenter le taux de diagnostic positif à 11/38. Mais ne pouvant avoir de moyen de vérification de leur véritable état intra-utérin, nous avons établi que les embryons dégénérés ne s'étaient pas développés.

Pour vérifier un protocole de congélation *in vivo*, il faudrait donc avoir la certitude du développement de l'embryon. Le choix de visualiser le battement cardiaque est un bon moyen de diagnostiquer la viabilité de l'embryon. Cependant, si on utilise un transfert multiple pour les avantages présentés précédemment, deux limites apparaissent à l'utilisation d'une échographie de contrôle à plus de 20 jours. Le transfert multiple nécessite une collecte embryonnaire pour tester la parenté des embryons. Or, cette collecte ne peut se faire trop tardivement à cause du risque d'implantation de l'embryon à J15 chez les ponettes (Flood, 1993). La résorption spontanée d'un des deux embryons représente la deuxième limite du diagnostic tardif de gestation par échographie lors du transfert multiple. C'est en effet un processus qui se produit couramment lors de gestation gémellaire et qui interférerait avec les réels échecs de développement.

Un diagnostic échographique aux alentours de J12 semble un bon compromis tout en sachant que le diagnostic par échographie à cette date est délicat (petite taille de la vésicule qui est mobile). La combinaison avec la collecte embryonnaire apporte alors une confirmation supplémentaire même si les risques de perte de l'embryon à la collecte persistent. En outre, de nombreuses techniques d'évaluation de l'embryon à la décongélation (annexe 2) restent à corrélérer avec le développement *in vivo* de l'embryon afin de pouvoir les utiliser comme valeur prédictive objective pour tester différents protocoles de congélation ou pour décider de la remise en place d'un embryon lors de futurs programmes commerciaux.

5.4 ***Le volume : un indicateur des flux de cryoprotecteurs***

Les enveloppes externes et particulièrement la capsule sont responsables des faibles variations du volume externe lors de l'étude. Il est alors intéressant d'analyser les variations du volume interne.

Pour cela, une première hypothèse à considérer est l'absence de différence d'épaisseur de capsule entre les embryons analysés, qui sont collectés au même stade (morula ou jeune blastocyste). En effet, une différence d'épaisseur entraînerait une différence de perméabilité du cryoprotecteur et cela pourrait interférer avec les variations de volume interne. Une autre hypothèse est la corrélation entre les variations du volume interne et celles des cellules embryonnaires. C'est en effet une approximation puisque le blastocoïde est présent à ce stade de développement et occupe un certain espace. Il participe donc aussi aux variations de volume. Bruyas *et al.* (1993) visualisent au microscope électronique l'espace occupé par le blastocoïde et constatent la disparition du blastocoïde chez certains embryons cryopréservés. Les variations de volume étant la conséquence des flux de cryoprotecteurs, il serait judicieux de visualiser plus précisément ce flux en observant des cryoprotecteurs marqués.

Suivre les variations de volume interne présente un double intérêt dans l'évaluation de l'embryon. Premièrement, un embryon qui ne présente aucune variation de volume suite au traitement qu'il subit est susceptible de ne plus avoir une membrane fonctionnelle. De plus, on peut faire l'hypothèse qu'un embryon qui est soumis à de fortes variations de volumes a subi des dommages cellulaires qui peuvent altérer sa viabilité. La perméabilité membranaire peut être atteinte. Afin d'éviter cela, il existe des limites de gonflement ou de contraction des embryons ; Schneider *et al.* (1984) donnent une limite supérieure de volume à 2,7 fois le

volume de l'embryon en milieu isotonique pour des embryons bovins. Ils expliquent cette expansion possible grâce aux microvillosités qui recouvrent les membranes. Nos embryons sont loin d'avoir atteint une telle augmentation de volume. On peut admettre que leur gonflement n'est pas néfaste.

A l'ajout du cryoprotecteur, les embryons de chaque lot se comportent de façon identique et attendue ; ils perdent de l'eau donc diminuent de volume. Dans le lot d'ajout direct, les valeurs du volume au cours de l'immersion dans un milieu avec du glycérol 10% ne sont pas relevées. Cependant, les embryons ont été observés à la loupe binoculaire au cours de cette période. On a remarqué que les embryons du lot direct se contractent de façon beaucoup plus intense et plus rapide (à 30 secondes). Ils se regonflent par la suite et sont stationnaires le reste du temps. Pfaff *et al.* (1993) ont mesuré cela avec plus de précision et retrouvent cette même variation de volume. Pour le lot témoin, les variations de volume sont moins intenses et il n'est pas possible de les voir se regonfler. Les résultats de viabilité des embryons ne permettent pas de dire qu'un lot a de meilleurs résultats. On peut donc faire l'hypothèse que des variations rapides et intenses (mais ne dépassant pas un certain degré) ne sont pas néfastes à l'embryon. De plus, Pfaff *et al.* (1993) ont mis en évidence que les embryons étaient moins perméables au glycérol qu'à l'éthylène glycol. Ceci montre l'intérêt de forcer cette pénétration malgré les variations de volume qui en découlent.

On remarquera que même si l'embryon reste un certain temps dans le cryoprotecteur, il ne retrouve pas son volume initial au bout de ce temps.

Les embryons décongelés sont retrouvés plus gros qu'avant la congélation. Cependant, aucune variation de concentration du milieu n'a été imposée. De plus, si l'on considère que la congélation lente essaie de déshydrater les cellules embryonnaires afin de minimiser les dommages par les cristaux de glace, les embryons devraient avoir tendance à diminuer de volume. Si ce n'est pas un facteur osmotique qui est en jeu, peut-être est-ce un facteur thermique qui intervient. La décongélation s'effectue dans un bain marie à 37°C, température supérieure à celle de la mise en paillette. Il y a peut-être une reprise de pénétration de cryoprotecteur accompagnée d'eau donc d'une augmentation de volume. Là encore un marquage du cryoprotecteur serait intéressant. Suivre les variations de volume au cours de la cryoconservation pourrait également montrer si cette augmentation de volume est progressive (il y aurait alors des échanges qui se poursuivraient à basse température) ou brutale.

Pour finir, nous nous intéressons aux étapes de retrait du cryoprotecteur. Le volume a tendance dans le lot direct à diminuer et celui du lot témoin reste stable. La diminution est la variation prévisible. Elle est due à la sortie du cryoprotecteur et de l'eau. La présence de saccharose dans la solution de dilution évite un choc osmotique par entrée d'eau brutale dans les cellules. L'embryon dont le volume continue de croître (Figure 10) ne doit plus avoir des membranes fonctionnelles, rendues perméables par le processus de congélation-décongélation. Il biaise certainement la légère croissance de la moyenne des volumes internes du lot témoin.

En conclusion de cette analyse de la variation des volumes, on retiendra qu'elle renseigne sur la pénétration du cryoprotecteur. Ainsi ce peut être un moyen de contrôle lors de la cryopréparation afin de ne pas faire subir à l'embryon de trop grosses variations de volumes. D'après Schneider *et al.* (1984), il est possible de calculer les techniques optimales

d'ajout et de retrait du cryoprotecteur grâce à des équations valables pour un type de cryoprotecteur et un stade de développement embryonnaire. La connaissance préalable du coefficient de perméabilité des embryons au cryoprotecteur est nécessaire. Ces équations ne semblent pas employées couramment ; on peut imaginer que c'est parce que la réalité est en décalage avec la théorie ou parce que les équipes de chercheur préfèrent essayer des protocoles de façon plus empirique. Quel que soit le protocole utilisé, il existe pour chaque type de cellule des variations extrêmes de volume à ne pas atteindre (Mazur, 1970), que l'on se doit de contrôler selon l'ajout ou le retrait du cryoprotecteur ; deux phases essentielles dans la cryopréservation.

5.5 Score morphologique : une bonne évaluation de la viabilité *in vivo* ?

Il n'existe pas de différence significative entre les deux lots pour la note morphologique au retrait du cryoprotecteur. De plus, nous n'avons pas mis en évidence de différence de viabilité *in vivo* à la recollecte. Il n'est donc pas possible d'établir *a priori* un lien entre le score et le diagnostic de gestation.

Cependant, le test statistique montre que le score avant mise en place n'est pas un indicateur de développement car non corrélé au résultat du diagnostic de gestation. Cela peut conforter le fait que nous ayons mis en place des embryons de score 4. Cette manipulation a surtout été réalisée dans le but de conserver les paires constituées tout en comptant sur l'augmentation du signal embryonnaire en plaçant deux structures embryonnaires (Ball *et al.*, 1989). Mais face à l'absence de lien entre le score et le développement, il ne faut pas exclure les embryons de grade 4. Le score morphologique n'étant pas un signe certain de viabilité, il faut se fier à d'autres moyens d'évaluation moins subjectifs (Annexe 2).

5.6 Méthode d'ajout du cryoprotecteur

5.6.1 Intérêt de l'ajout direct du cryoprotecteur

L'incorporation en une étape semblait avoir donné des résultats supérieurs (pourcentage de cellules mortes significativement inférieur) à une incorporation classique en quatre étapes (Allard, 2004). L'expérience « de contrôle » *in vivo* réalisée ici ne montre aucune supériorité de la technique d'ajout direct et pas non plus d'infériorité.

L'obtention d'un minimum d'étape d'incorporation simplifierait la technique de cryopréservation (économie de temps et épargne de la préparation assez complexe des milieux d'incorporation nécessitant des ajustements par osmomètre).

L'utilisation d'un seul milieu à forte concentration permet un flux d'entrée de cryoprotecteur plus rapide et intense car on impose un gradient entre les concentrations intracellulaire et extracellulaire plus important.

Young *et al.* (1997) utilisent cette propriété pour forcer le cryoprotecteur à pénétrer dans des embryons de taille supérieure à 300 µm qu'ils congèlent ensuite de façon

conventionnelle. En utilisant une concentration de 4,0 M suivie d'une concentration de 2,0 M de glycérol, ils obtiennent des résultats convenables en culture, après décongélation. Cette technique dite « step-down equilibration » est basée sur l'importance d'un flux d'entrée de cryoprotecteur intense et rapide.

Réduire le nombre d'étapes d'incorporation du glycérol ne semble pas néfaste quant à la viabilité des embryons d'après Skidmore *et al.* (1991). Avec quatre étapes d'incorporation (à 2,5%, 5%, 7,5% et 10%) ou avec deux étapes (5% et 10%), les taux de diagnostic de gestation à J50 sont proches (55% et 40% respectivement). Cependant, il faut noter qu'ils utilisent une courbe de refroidissement différente pour chaque expérience (le passage de 24°C à -6°C se fait respectivement à 1°C/min et 4°C/min).

La recherche de la réduction du nombre d'étapes d'incorporation se pratique aussi chez les bovins. Martinez *et al.* (2002) montre une équivalence de trois méthodes de congélation lente : la première utilise du glycérol incorporé à 5% puis 10%, la seconde du glycérol incorporé directement à 10% et la troisième du l'éthylène glycol incorporé directement à 1,5M. Les taux de diagnostic de gestation à 45 jours sont respectivement de 40,4%, 39,7% et 45,4%. Bien que ces résultats concernent les embryons bovins, ils sont encourageants quant à la réduction du nombre d'étapes d'incorporation.

Cependant, il faut considérer la toxicité d'une trop forte concentration intracellulaire de cryoprotecteur et la possibilité d'un choc osmotique. Mais la technique de « step-down equilibration » de Young *et al.* qui fonctionne sur les gros embryons pourrait être adaptée aux jeunes blastocystes. De plus, parmi les essais réalisés avec des protocoles de congélation lente, un certain nombre réduit les quatre étapes à trois voire deux étapes (Allard, 2004). Lors d'emploi du glycérol, on retrouve fréquemment deux étapes d'ajout à 5% puis 10% et quelques cas d'ajout en trois étapes (0,5M, 1M puis 1,5M).

Notre expérience ne montrant aucune différence de résultats de gestation entre les deux lots, il semblerait donc possible d'utiliser la méthode la plus rapide et la moins complexe : c'est-à-dire l'incorporation directe de cryoprotecteur.

5.6.2 Temps de contact avec le cryoprotecteur : un paramètre à définir

Le temps de contact entre l'embryon et le cryoprotecteur paraît important quant à la quantité de cryoprotecteur pénétrant dans l'embryon. Un temps de contact trop long pourrait nuire à l'embryon par la toxicité éventuelle du cryoprotecteur. Mais un temps trop court ne permettrait pas une concentration intracellulaire suffisante pour être efficace, surtout pour les embryons plus âgés (enveloppes à traverser). Allard (2004) n'a pas noté de modification de la viabilité des embryons après allongement du temps de contact avec une solution de glycérol (le temps de contact allongé étant celui de l'étape à 10%). Martinez *et al.* (2002), sur les embryons de bovins et avec de l'éthylène glycol à 1,5M, n'observent pas de différence de taux de gestation entre des temps de contact de 5 minutes et de 20 minutes. Ils remarquent tout de même une différence entre les morula et les blastocystes : les morula ont un taux de gestation inférieur dans le lot de contact à 20 minutes. La toxicité du cryoprotecteur est certainement à prendre en compte dans le cas des jeunes embryons.

Le temps de contact pourrait donc intervenir d'autant plus que l'embryon est jeune c'est-à-dire qu'il laisse passer plus facilement le cryoprotecteur (cas des embryons équins). Il

faudrait alors comparer une échelle de temps de contact plus large pour différents stades de développement, afin d'affiner les techniques employées actuellement.

5.6.3 Utilisation d'adjuvants au cryoprotecteur

Pour potentialiser la cryoprotection, on peut envisager d'employer des molécules non pénétrantes. Elles jouent le rôle de tampon osmotique et aident à la déshydratation nécessaire à la congélation. Ces molécules sont souvent rajoutées à la solution de retrait du cryoprotecteur pour minimiser l'entrée d'eau dans les cellules embryonnaires. Leur emploi à l'ajout du cryoprotecteur est moins fréquent. Ferreira *et al.* (1997) ont testé un ajout de glycérol en deux étapes avec l'ajout de saccharose à 0,25M dans la deuxième solution. Cependant, le taux de gestation n'est que de 13,3% et l'analyse de l'ultrastructure ne révèle aucun bénéfice. Pour les embryons bovins, l'emploi combiné d'éthylène glycol et de saccharose à 0,1M a un effet positif (Martinez *et al.*, 2002). L'étude de Martinez confirme également l'effet délétère d'une trop forte concentration de sucre évoqué par leurs prédecesseurs. Ceci pourrait tout de même inciter à revoir la concentration employée avec les embryons équins et peut être à trouver un compromis comme Martinez *et al.* l'ont fait avec des embryons bovins.

6 CONCLUSION

Le problème majeur de la congélation des embryons équins reste la capsule, enveloppe externe qui perturbe les flux de cryoprotecteur. Cette enveloppe s'épaississant avec l'âge de l'embryon, les gros embryons sont d'autant plus délicats à cryoconserver. En effet, que ce soit la congélation conventionnelle ou la vitrification, le nombre de gestations déclenchées est souvent nul.

Il faut alors travailler sur les jeunes embryons qui donnent des résultats tout à fait honorables avec différentes techniques de congélation. Dans ce cas, il est nécessaire d'assurer un taux de collecte d'embryons de 6 jours suffisant, ce qui semble possible en évaluant correctement le temps écoulé depuis l'induction de l'ovulation.

Étant donné les premiers résultats encourageants d'un modèle commercial de congélation conventionnelle de petits embryons, il est intéressant :

- d'améliorer le rendement des méthodes de congélation
- de simplifier ces méthodes de congélation.

L'étude présentée ici comparait une méthode d'ajout du cryoprotecteur en une étape à une méthode d'ajout en quatre étapes, couramment employée. Les résultats de développement *in utero* des embryons de 11 jours nous ont amenés à la conclusion suivante :

- Aucune différence ou absence de différence entre les deux méthodes d'ajout n'a pu être mise en évidence avec 19 embryons par lot. On remarque tout de même que la méthode d'ajout direct ne semblerait pas moins efficace que la méthode habituelle en quatre étapes.

Bien que cette étude ait l'avantage d'évaluer de façon optimale la technique de congélation par le diagnostic de gestation, il faudrait donc réitérer cette même expérience avec plus d'embryons. Cependant, cette technique d'ajout en une étape peut être à conserver étant donné :

- son apparente équivalence d'efficacité avec la technique classique
- sa simplicité : elle est plus rapide et nécessite moins de préparation préalable (annexe 1).

Comme pour le porc à partir de 1997, on peut espérer que le développement de la cryoconservation des embryons équins s'accélère. En effet, le métabolisme et les aspects biomoléculaires de l'embryon équin commencent à être bien étudiés. Les objectifs seront alors un meilleur rendement et des techniques plus rapides. Le transfert direct après décongélation et les techniques d'OPS sont des solutions envisageables.

Rapport Gratuit.Com

BIBLIOGRAPHIE

ALLARD, A.

La congélation de l'embryon équin : influence des conditions d'incorporation du glycerol.

Th. : Med.vet. : Toulouse : 2004 ; 83. 151.

BALL, B.A., ALTSCHUL, M., HILLMAN, RB.

Luteal maintenance in mares after transfer of equine trophoblastic vesicles.

Equine vet. J., 1989, supp 8, 21-24.

BARRY, B.E., THOMPSON, D.L., WHITE, K.L., WOOD, T.C., HEHNKE, K.E., RABB, M.H., COLBORN, D.R.

Viability of inner cell mass versus trophectodermal cells of frozen-thawed horse embryos.

Equine vet. J., 1989, supp 8, 82-83.

BASS, L.D., DENNISTON, D.J., MACLELLAN, L.J., McCUE, P.M., SQUIRES, E.L.

Methanol as cryoprotectant for equine embryos.

Reprod. Fert. And Dev., 2003, 16, 163.

BRUYAS, J.F., BEZARD, J., LAGNEAUX, D., PALMER, E.

Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation : differential effects on inner cell mass and trophoblast cells.

J. Reprod. Fert., 1993, 99, 15-23.

BRUYAS, J.F., MARCHAND, P., FIENI, F., TAINTURIER, D.

The inability of DMSO to effectively cryoprotect day 6,5 horse embryos.

Theriogenology, 1997, 47, 387.

BRUYAS, J.F., SANSON, J.P., BATTUT, I., FIENI, F., TAINTURIER, D.

Comparison of the cryoprotectant properties of glycerol and ethylene glycol for early day 6 equine embryos.

J. Reprod. Fert., 2000, supp 56, 549-560.

BRUYAS, J.F.

Nouveautés en matière de transplantation embryonnaire équine.

In : ACCRE, Transplantation embryonnaire, Le Pin, France, 25 novembre 2004.

CAMILLO, F., CELA, M., VANNOZZI, I., ROMAGNOLI, S., ARIA, G.

The use of early pregnant mares as embryo recipients.

Equine vet. J., 1997, supp **25**, 77-79.

CARACCIOLLO DI BRIENZA, V., SQUIRES, E.L., CARNEVALE, E.M.

Establishment of pregnancy after vitrification of equine embryos.

Reprod. Fert. Dev., 2003, **16**, 165.

CARNEVALE, E.M., RAMIREZ, R.J., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, D.K., VANDERWALL, D.K., McCUE, P.M.

Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer.

Theriogenology, 2000, **54**, 965-979.

CARNEVALE, E.M., COUTINHO DA SILVA, M.A., MACLELLAN, L.J., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L.

Use of parentage testing to determinate optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares.

Reproduction, 2004, **128**, 623-628.

CARNEVALE, E.M., ELDRIDGE-PANUSKA, W.D., CARACCIOLLO DI BRIENZA,V., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L.

Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos.

In : 6th international symposium on equine embryo transfer, Rio de Janeiro, Brazil, 4-6 august 2004.

CASTANHEIRA, P.N., AMARAL, D.C.G., VASCONCELOS, A.B., ARANTES, R.M.E., STAHLBERG, R., LAGARES, M.A.

Cryopreservation of equine embryos by vitrification.

In : 6th international symposium on equine embryo transfer, Rio de Janeiro, brazil, 4-6 august 2004.

CZLONKOWSKA, M., BOYLE, M.S., ALLEN, W.R.

Deep freezing of horse embryos.

J. Reprod. Fert., 1985, **75**, 485-490.

DOBRINSKY, J.R.

Cellular approach to cryopreservation of embryos

Theriogenology, 1996, **45**, 17-26.

DUCHAMP, G., BOUR, B., COMBARNOUS, Y., PALMER, E.

Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare.

J. Reprod. Fert., 1987, **supp 35**, 221-228.

ELDRIDGE-PANUSKA, W.D., CARACCIOLLO DI BRIENZA, V., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L., CARNEVALE, E.M.

Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos.

Theriogenology, 2005, **63**, 1308-1319.

FAHY, G.M.

The role of nucleation in cryopreservation.

In : LEE, R.E., WARREN, G.J., GUSTA, L.V.

Biological ice nucleation and its applications.

APS PRESS, 315-336.

FERREIRA, J.C., MEIRA, C., PAPA, F.O., LANDIN e ALVARENGA, F.C., ALVARENGA, M.A., BURATINI, J.

Cryopreservation of equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2-propanediol.

Equine vet J., 1997, **supp 25**, 88-93.

FLOOD, P.F.

Fertilization, early development, and the establishment of the placenta.

In : KINNON, A.O., VOSS, J.L.

Equine reproduction. Philadelphia, London :Lea & Febiger, 1993, 473-483.

GUERAND, M., MAHLA, R., LAGNEAUX, D., AMIGUES, Y., PALMER, E., BEZARD, J.

Parentage testing of Day 10 equine embryos by amplified PCR analysis of microsatellites.

Equine vet. J., 1997, **supp 25**, 69-71.

GUIGNOT, F.

Le point sur la cryopréservation des embryons

In : Biotechnologies de la reproduction : quoi de neuf, Alfort, France, 2 décembre 2003.

HOCHI, S.,

Influence of relative embryonic volumes during glycerol equilibration on the survival of frozen-thawed equine blastocysts.

J. Reprod. Dev., 1994, **40**, 243-249.

HOCHI, S., FUJIMOTO, T., OGURI, N.

Large equine blastocysts are damage by vitrification procedure.

Reprod. Fertil. Dev., 1995, **7**, 113-117.

HOCHI, S., MARUYAMA, K., OGURI, N.

Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose.

Theriogenology, 1996, **46**, 1217-1224.

HUHTINEN, M., LAGNEAUX, D., KOSKINEN, E., PALMER, E.

The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos.

Equine vet. J., 1997, supp **25**, 94-97.

HUTHINEN, M., SJOHOLM, A., PARANKO, J.

Comparison of glycerol and ethylen glycolin equine embryo freezing using confocal microscopy, DAPI-staining and nonsurgical transfer.

In : 5th international symposium on equine embryo transfer, Saari, Finland, 6-9 july 2000. Havemeyer foundation 2000, 52-53.

IMEL, K.J., SQUIRES, E.L., ELSDEN, R.P., SHIDELER, R.K.

Collection and transfer of equine embryos.

JAVMA, 1981, **179**, 987-991.

KRUUV, J., GLOFCHESKI, D.J., LEPOCK, J.R.

Protective effect of L-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells.

Cryobiology, 1988, **25**, 121-130.

LAGNEAUX, D., PALMER, E.

Are pony and larger mares similar as recipients for non-surgical transfer of Day 7 embryos ?

Equine vet. J., 1989, **supp 8**, 64-67.

LAGNEAUX, D., PALMER, E.

Non surgical recovery of morulae in the mare for freezing purposes using induction of ovulation.

J. Reprod. Fertil., 1991, Abstract series n°8, Joint meeting, Paris, 13-14th december 1991, n°32, 21.

LAGNEAUX, D., HUHTINEN, M., KOSKINEN, E., PALMER, E.

Effect of anti-freeze protein (AFP) on the cooling and freezing of equine embryos as measured by DAPI-staining.

Equine vet. J., 1997, **supp 25**, 85-87.

LAGNEAUX, D., POMARICI, A.M., SATTLER, M., BRUNEAU, B., DUCHAMP, G., CAMILLO, F., PALMER, E.

Effect of L-glutamine for freezing equine embryos : evaluation by DAPI staining and transfer of multiple embryos to recipient mares.

J. Reprod. Fert., 2000, **supp 56**, 561-568.

LASCOMBES, F.A., PASHEN, R.L.

Results from embryo freezing and post ovulation breeding in a commercial embryo transfer programme.

In : The 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, 6-9 July 2000. Editors : T. Katila and J.F. Wade, 1997. 95-96.

LEGRAND, E., BENCHARIF, D., BATTUT, I., TAINTUTIER, D., BRUYAS, J.-F.

The effect of glycerol 1M on frozen horse embryos : localization of damaged cells.

In : 15^e réunion A.E.T.E., Lyon, France, 10-11 septembre 1999. 182.

LEGRAND, E., KRAWIESKI, J.M., TAINTURIER, D., CORNIERE, P., DELAJARRAUD, H., BRUYAS, J.-F.

Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos ?

In : The 5th International Symposium on Equine Embryo transfer, Saari, Finland, 6-9 July 2000. Editors : T. Katila and J.F. Wade.

LEGRAND, E., BENCHARIT, D., BARRIER-BATTUT, I., DELAJARRAUD, H., CORNIERE, P., FIENI, F., TAINTURIER, D., BRUYAS, J.-F.

Comparison of pregnancy rates for days 7-8 equine embryos frozen in glycerol with or without previous enzymatic treatment of their capsule.

Theriogenology, 2002, **58**, 721-723.

LEIBO, S.P.

A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos.

Theriogenology, 1984, **21**, 767-790.

MACLELLAN, L.J., CARNEVALE, E.M., COUTINHO DA SILVA, M.A., McCUE, P.M., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L.

Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin.

Theriogenology, 2002, **58**, 717-720.

MAGISTRINI, M., COUTY, I., PALMER, E.

Interaction between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival.

Acta vet. Scand., 1992, supp **88**, 97-110.

MANDELBAUM, J.

Cryoconservation de l'ovocyte et de l'embryon humain : histoire, technique, intérêt.

In : HAMAMAH, S., MENEZO, Y.

Ovocyte et embryon, de la physiologie à la pathologie.

Paris : Ellipses, 1999, 311-338.

MAZUR, P.

Cryobiology : The Freezing of Biological Systems.

Science, 1970, **168**, 939-949.

MAZUR, P.

Basic concepts in freezing cells.

In : 1st international conference on deep freezing boar semen, Uppsala, Sweden, 1985, 91-111.

MARTINEZ, A.G., BROGLIATTI, G.M., VALCAREL, A., DE LAS HERAS, M.A.

Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos : a field trial.

Theriogenology, 2002, **58**, 963-972.

McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L.

Morphological assesment of the equine embryo.

JAVMA, 1988, **192**, 401-406.

McKINNON, A.O. *et al.*

Diagnostic ultrasonography.

In : KINNON, A.O., VOSS, J.L.

Equine reproduction. Philadelphia, London : Lea & Febiger, 1993, p266

McKINNON, A.O.

Equine embryo transfer.

<http://www.harness.org.au/99wldcon/PMCKINN5.HTM>

MEIRA, C., ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., OBA, E., LANDIM E ALVARENGA, F ;C ;

Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants.

Equine Vet. J., 1993, supp **15**, 64-66.

MERTON, S.

Chapter 2 : Morphological evaluation of embryos in domestic species.

In : SOOM, A.V., BOERJAN, M.

Assessment of mammalian embryo quality : invasive and non invasive techniques.

2002.

MOUSSA, M., BERSINGER, I., DOLIGEZ, P., GUIGNOT, F., DUCHAMP, G., VIDAMENT, M., MERMILLOD, P., BRUYAS, J.-F.

In vitro comparison of two cryopreservation techniques for equine embryos : slow freezing and open pulled straw (OPS) vitrification.

Theriogenology, 2005, **64**, 1619-1632.

OBERSTEIN, N., O'DONOVAN, M.K., BRUEMMER, J.E., LANE, M., SEIDEL, G.E., CARNEVALE, E.M., SQUIRES, E.L.

Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventionnal slow cooling methods.

Theriogenology, 2001, **55**, 607-613.

PFAFF, R., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L., JASKO, D.J.

Permeability of equine blastocysts to ethylen glycol and glycerol.

Theriogenology, 1993, **39**, 284.

PRUITT, J.A.

Viability of equine embryos following fluorescein diacetate staining.

Theriogenology, 1988, **29**, 291.

RIEGER, D., BRUYAS, J.-F., LAGNEAUX, D., BEZARD, J., PALMER, E.

The effect of cryopreservation on the metabolic activity of Day-6,5 horse embryos.

J. Reprod. Fertil., 1991, **supp 44**, 411-417.

SCHNEIDER, U., MAZUR, P.

Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos.

Theriogenology, 1984, **21**, 68-79.

SEIDEL, G.E.

Cryopreservation of equine embryos in 1,2 propanediol.

Equine vet. J., 1989, **supp 8**, 87-88.

SEIDEL, G.E.

Cryopreservation of equine embryos.

Vet Clin North Am Equine Pract, 1996, **12**(1), 85-99.

SHAW, J.M.

Cryopreservation of oocytes and embryos.

In : TROUNSON, A.O., GARDNER, D.K.

Handbook of In Vitro Fertilization ; 2nd edition.

CRC Press LLC, 2000, 374-412.

SKIDMORE, J.A., BOYLE, M.S., ALLEN, W.R.

A comparison of two different methods of freezing horse embryos.

J. Reprod. Fert., 1991, **supp 44**, 714-716.

SLADE, N.P., TAKEDA, T., SQUIRES, E.L., ELSDEN, R.P., SEIDEL, G.E.

A new procedure for the cryopreservation of equine embryos.

Theriogenology, 1985, **24**, 45-58.

SQUIRES E.L., IULIANO, M ;F., SHIDELER, R.K.

Factors affecting the success of surgical and non surgical equine embryo transfer.

Theriogenology, 1982, **17**, 35-41.

SQUIRES, E.L., CARNEVALE, E.M., McCUE, P.M., BRUEMMER, J.E.

Embryo technologies in the horse.

Theriogenology, 2003, **59**, 151-170.

STOUT, T.A.E., MEADOWS, S., ALLEN, W.R.

Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and embryonic survival *in vivo*.

Animal Reproduction Science, 2005, **87**, 269-281.

THARASANIT, T., COLENBRANDER, B., STOUT, T.A.E.

Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos.

Reproduction, 2005, **129**, 789-798.

VAJTA, G., BOOTH, P.J., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H.

Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method.

Cryo-Letters, 1997, **18**, 191-195.

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H.

Open Pulled Straw (OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.

Mol. Reprod. Dev., 1998, **51**, 53-58.

WHITTINGHAM, D.G., LEIBO, S.P., MAZUR, P.

Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C.

Science, 1972, **178**, 411-414.

YAMAMOTO, Y., OGURI, N., TSUTSUMI, Y., HACHINOHE, Y.

Experiments in the freezing and storage of equine embryos.

J. Reprod. Fert., 1982, **supp 32**, 399-403.

YOUNG, C.A., SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E.

Cryopreservation procedures for Day 7-8 equine embryos.

Equine vet. J., 1997, **supp 25**, 98-102.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des milieux

Préparation des milieux de congélation (incorporation de cryoprotecteur)

Ces milieux de congélation ont été préparés à l'avance car ils ont été conservés congelés jusqu'à utilisation.

Références :

Glycérol : Sigma G 2025, PM= 92,09, densité : 1,25 à 1,26

L-glutamine : Sigma G 3126, PM= 146,14

Solution de F1 : PBS avec 4g/l de BSA, antibiotiques et antifongiques, IMV, France

Objectif :

La quantité nécessaire de milieu de congélation à 10% de glycérol soit 1,3 M a tout d'abord été confectionnée. On a ensuite fabriqué les milieux à 7,5%, 5% et 2,5% en utilisant à chaque fois le milieu 10% précédent dilué par un milieu de base.

Evaluation quantitative (en ml) des besoins en milieux pour l'expérimentation :

Lot	Nombre d'embryons	Glycérol 2,5%	Glycérol 5%	Glycérol 7,5%	Glycérol 10%
Témoin	20	20	20	20	20
Direct	20	0	0	0	20
Quantité à préparer (ml)		30	30	30	50

Les bains dans les milieux de congélation se faisant par 1 ml pour un embryon, des quantités supérieures aux besoins ont été préparées.

Préparation de la solution de base (SB) pour tous les milieux :

Cette solution est un mélange d'une solution commerciale F1 et de glutamine.

On a mis en flacon stérile 200ml de F1 auquel 2,92g de L-glutamine préalablement pesé ont été ajoutés.

Mesure de l'osmolarité :

Un osmomètre a permis de mesurer la pression osmotique (PO) en milliosmole. Chaque solution a ainsi été contrôlée pour vérifier une mesure proche de la pression osmotique

calculée (sachant qu'une mole de solution dissoute dans l'eau exerce une pression osmotique d'une osmole).

Il en a été ainsi pour la solution de base (SB) :

$$PO_{SB \text{ calculée}} = PO_{F1 \text{ mesurée}} + PO_{0,1M \text{ glutamine}}$$

$$PO_{SB \text{ calculée}} = 390 \text{ mOsm}$$

$$PO_{SB \text{ mesurée}} = 401 \text{ mOsm}$$

Préparation de la solution à 10% de glycérol :

- Manipulation

Dans un Erlenmeyer, nous avons ajouté 10ml de glycérol aux 90 ml de solution de base déjà présents. La manipulation du glycérol nécessite certaines précautions. Ainsi il faut bien essuyer l'extérieur du cône avant de renvoyer le glycérol dans la solution de base. Pour extraire tout le glycérol, visqueux, de la pipette, on vide celle-ci en réalisant plusieurs coups de pompe. Le transfert a été réalisé en deux fois en changeant le cône pour chaque 5ml transferé. Le contenu de l'Erlen Meyer a ensuite été mélangé « à la main ».

- Osmolarité

Un étalonnage préalable indiquait que 1% de glycérol apporte 148,4 mOsm.

$$PO_{10\% \text{ calculée}} = PO_{SB \text{ mesurée}} + 10 \times 148,4$$

$$PO_{10\% \text{ calculée}} = 1885 \text{ mOsm}$$

$$PO_{10\% \text{ mesurée}} = 2206 \text{ mOsm}$$

- Ajustement de la pression osmotique

Calcul du pourcentage de solution de base à rajouter :

$$X = (1885 - 2206) / (401 - 2206) = 18,4\%$$

Il fallait donc rajouter théoriquement 18,4ml de solution de base dans les 100ml de milieu à 10% de glycérol pour obtenir la $PO_{calculée}$. Face aux variations de l'osmomètre, nous avons décidé d'introduire progressivement la solution de base et de mesurer au fur et à mesure la PO. Ainsi, 10ml puis 3ml, 3ml et enfin 0,5ml ont été ajoutés pour s'arrêter à une $PO=1854\text{mOsm}$.

On remarque ici l'aspect empirique de cette préparation. La pression osmotique nécessite cet ajustement surtout pour la solution à 10% de glycérol car c'est le dernier bain pour l'embryon avant congélation. Pour les autres concentrations de glycérol, les mesures de PO étant bien réparties, cet ajustement n'a pas été nécessaire. En effet, seule une progression régulière des concentrations (soit des pressions osmotiques) comptent afin d'éviter un choc osmotique.

Préparation des solutions à 7,5 %, 5%, 2,5% :

Les manipulations se font en mélangeant les volumes indiqués dans le tableau suivant dans des tubes FALCON de 50 ml.

Type de milieu	Volume de glycérol 10% (ml)	Volume de solution de base (ml)
Glycérol 7,5%	22,5	7,5
Glycérol 5%	15	15
Glycérol 2,5%	7,5	22,5

Les osmolarités calculées et mesurées ont été les suivantes :

$$PO_{7,5\% \text{ calculée}} = 1514 \text{ mOsm}$$

$$PO_{7,5\% \text{ mesurée}} = 1434 \text{ mOsm}$$

$$PO_{5\% \text{ calculée}} = 1143 \text{ mOsm}$$

$$PO_{5\% \text{ mesurée}} = 1037 \text{ mOsm}$$

$$PO_{2,5\% \text{ calculée}} = 772 \text{ mOsm}$$

$$PO_{2,5\% \text{ mesurée}} = 704 \text{ mOsm}$$

Nous avons gardé également un tube FALCON de 50ml de solution à 10%.

Répartition des milieux dans les tubes Eppendorf sous hotte à flux laminaire :

Les tubes Eppendorf ont été répartis, bouchon ouvert, dans un support à cet effet. Avec une seringue de 20ml aiguille montée, nous avons prélever le contenu des tubes corning. Après avoir remplacé l'aiguille par un filtre (Low Binding Protein), nous avons rempli les eppendorfs de 1,5ml avec 1ml environ de solution. Ceci a été répété jusqu'à terminer le tube FALCON. Chaque bouchon d'Eppendorf était ensuite marqué en indiquant le pourcentage de glycérol..

Tous les milieux de congélation ont été aliquotés de la même façon puis mis dans des cartons au congélateur à -18°C.

Préparation des milieux de décongélation (retrait du cryoprotecteur)

Évaluation quantitative des besoins en milieux de décongélation :

Chaque embryon a été décongelé dans 1 ml de solution de décongélation, cependant les quantités à préparer ont été surévaluée par précaution.

Lot	Nombre d'embryons	Glycérol 7,5% + 0,25M sucrose	Glycérol 5% + 0,1M sucrose	Glycérol 2,5% + 0,1M sucrose	0,1M sucrose	F1
Témoin	20	20	20	20	20	20
Direct	20	20	20	20	20	20
Quantité à préparer (ml)		50	50	50	50	50

Récapitulatif des quantités nécessaires de chaque composant pour l'obtention des différents milieux de décongélation :

Milieu de décongélation	Volume total du tube (ml)	Glycérol 10% (ml)	F1 (ml)	Sucrose (g)
7,5% glycérol 0,25M sucrose	50	37,5	12,5	4,28
5% glycérol 0,1M sucrose	50	25	25	1,71
2,5% glycérol 0,1M sucrose	50	12,5	37,5	1,71
0,1M sucrose	50	0	50	1,71
F1	50	0	50	0
Total	250	75	175	9,41

Référence : Sucrose : Sigma S1888, PM= 342,30

Préparation de la solution de glycérol 10% :

Nous avons préparé 100 ml de cette solution en mélangeant doucement 90 ml de F1 à 10 ml de glycérol.

Préparation des solutions de décongélation :

Ces solutions ont été obtenues en mélangeant dans des tubes FALCON les composants comme indiqué dans le tableau récapitulatif. Chaque tube a été mélangé en agitant doucement.

Ces solutions ont été ensuite aliquotées de la même façon que les solutions de congélation puis mises au congélateur jusqu'à utilisation.

Mesure d'osmolarité

$$PO_{F1} = 295 \text{ mOsm}$$

$$PO_{10\% \text{ calculée}} = 1779 \text{ mOsm}$$

$$PO_{10\% \text{ mesurée}} = 1943 \text{ mOsm}$$

$$PO_{10\% \text{ ajustée}} = 1765 \text{ mOsm}$$

$$PO_{7,5\%+S \text{ mesurée}} = 1722 \text{ mOsm}$$

$$PO_{5\%+S \text{ mesurée}} = 1087 \text{ mOsm}$$

$$PO_{2,5\%+S \text{ mesurée}} = 729 \text{ mOsm}$$

$$PO_S \text{ mesurée} = 401 \text{ mOsm}$$

Afin d'obtenir des intervalles plus réguliers d'osmolarité entre les différentes solutions de retrait du cryoprotecteur, 2 ml de la solution à 7,5% de glycérol et 0,1M de sucrose ont été remplacés par 2ml de F1. On a ainsi obtenu : $PO_{7,5\%+S \text{ finale}} = 1639 \text{ mOsm}$.

Annexe 2 : Revue des méthodes d'évaluation de l'embryon.

Technique d'évaluation	Critères étudiés	Matériel & méthode	Avantages	Inconvénients	Exemples de référence
Stade de développement	Zone pellucide, capsule, blastomères, blastocoèle Classification : morula, jeune blastocyste, blastocyste, blastocyste épanoui, blastocyste éclos.	Loupe binoculaire	Reconnaitre les jeunes embryons Ecartez les oocytes		
Score morphologique	Blastomères, couleur, forme générale, enveloppes, espace périvitellin Classification : grades 1,2,3,4,5.	Loupe binoculaire		Méthode subjective Pas toujours significative de viabilité à l'instant t	McKinnon <i>et al.</i> , 1988
Mise en culture	Vitesse de clivage, réexpansion du blastocoèle, évolution du stade de développement	Milieux de cultures variés, atmosphère et température contrôlées	Ecartez les embryons incapables de se développer	Altération possible de l'embryon A combiner avec une évaluation morphologique	Bruyas <i>et al.</i> , 1997 Czonkowska <i>et al.</i> , 1985 Hochi <i>et al.</i> , 1996

Technique d'évaluation	Critères étudiés	Matériel & méthode	Avantages	Inconvénients	Exemples de référence
DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole)	Fluorescence bleue des noyaux de blastomères dégénérés	Microscope à fluo-rescence	Détection facile et non ambiguë Méthode non toxique pour l'embryon Corrélation négative au taux de gestation		Moussa <i>et al.</i> , 2004 Lagneau <i>et al.</i> , 2000
BrdU (5' Bromo-2'deoxy-Uridine)	Fluorescence verte des cellules embryonnaires entrant en phase S	Microscope à fluo-rescence, BrdU et immuno-globulines	Corrélation négative avec le DAPI	Coloration délicate	Moussa <i>et al.</i> , 2004
Hoechst 33342	Nombre total de cellules (fluorescence bleue)	Microscope à fluorescence	Simple, lecture immédiate à différée, peu cytotoxique		Oberstein <i>et al.</i> , 2001
TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling)	Fragmentation de l'ADN, signe précoce d'apoptose	Microscope à épifluorescence	Distinction plus précise et précoce des cellules mortes Corrélation positive au DAPI	Aucune étude réalisée en congélation actuellement	Moussa <i>et al.</i> , 2004
Iodure de propidium	Nombre de cellules par fluorescence bleue		Combinaison avec d'autres fluorochromes possible		Oberstein <i>et al.</i> , 2001
Rhodamine 123	Coloration des mitochondries		Information sur l'intégrité métabolique		

Technique d'évaluation	Critères étudiés	Matériel & méthode	Avantages	Inconvénients	Exemples de référence
FDA (Fluorescein DiAcetate)	Intensité de fluorescence	Lumière UV et microscope à fluorescence	Non toxique, corrélé au taux de gestation, indicateur de l'intégrité des membranes plasmatiques	Mesure du métabolisme de base et non du développement potentiel Faux positifs	Pruitt, <i>et al.</i> , 1988 Barry <i>et al.</i> , 1989
Marqueurs radioactifs (¹⁴ CO ₂ , ³ H ₂ O)	Quantité de production de ces marqueurs	Substrat radio-marqué	Evaluation de différentes voies métaboliques	Techniques spéciales Interprétation délicate	Rieger <i>et al.</i> , 1991
Composition du milieu de culture	Consommation de glucose, synthèse de lactate, consommation de pyruvate, consommation d'oxygène, présence de lactate-déshydrogénase, concentrations en acides aminés, hormones, cytokines et facteurs de croissance	Techniques de micro-analyses (micro-électrodes, microfluorescence...)		Equipement spécifique et personnel qualifié Pas toujours marqueurs de viabilité de l'embryon Pas encore employés pour les embryons équins	Rieger <i>et al.</i> , 1991
Histologie et ultrastructure	Localisation des lésions, noyaux pycnotiques, taux de nécrose...sur coupes d'embryons	Colorants (orceine, bleu de toluidine...), microscope optique ou électronique,	Etude plus précise des répercussions du cryoprotecteur		Rieger <i>et al.</i> , 1991 Bruyas <i>et al.</i> , 1993 Pfaff <i>et al.</i> , 1993 Legrand <i>et al.</i> , 1999 Ferreira <i>et al.</i> , 1997

Technique d'évaluation	Critères étudiés	Matériel & méthode	Avantages	Inconvénients	Exemples de référence
Echographie post transfert	Présence d'une vésicule embryonnaire Battements cardiaques	Echographe et sondes	Ne prédit pas la viabilité embryonnaire avant transfert	Certitude de développement (étape ultime d'évaluation d'une technique de congélation)	Huthinen <i>et al.</i> , 1997 Carraciolo di Brienza <i>et al.</i> , 2003 Hochi <i>et al.</i> , 1994 Bass <i>et al.</i> , 2003

Toulouse, 2005

NOM: PLOTTO

PRENOM: AURELIE

TITRE: LA CONGÉLATION DE L'EMBRYON EQUIN : COMPARAISON *IN VIVO* DE L'EFFET DE L'INCORPORATION DIRECTE OU PROGRESSIVE DU GLYCEROL SUR LA VIABILITE DES EMBRYONS

RESUME :

Alors que la congélation des embryons bovins est réalisée commercialement, la congélation des embryons équins reste en retard. Ceci est principalement dû à une spécificité morphologique, la capsule, qui perturbe les flux de cryoprotecteur. Étant donnée l'impossibilité de s'affranchir de cette barrière biologique, il est nécessaire d'améliorer la pénétration du cryoprotecteur dans l'embryon.

L'objectif de cette étude expérimentale était de comparer une incorporation directe d'une solution de glycérol 10% à une incorporation classique en quatre étapes. Les deux lots de 19 embryons de 6,75 jours ainsi formés ont ensuite suivi le même cycle de congélation, décongélation, transfert chirurgical, et enfin, collecte à l'âge de 11 jours.

Dans nos conditions expérimentales (absence de validité statistique), le développement *in vivo* n'a pas montré de différence d'efficacité entre une incorporation directe et une incorporation en plusieurs étapes.

MOTS CLES : cheval, embryons, congélation, cryoprotecteur, glycérol.

TITLE : CRYOPRESERVATION OF EQUINE EMBRYOS: *IN VIVO* COMPARISON BETWEEN DIRECT OR PROGRESSIVE GLYCEROL INCORPORATION

ABSTRACT :

While bovine embryo cryopreservation is carried out commercially, equine embryo cryopreservation is still lagging behind. This is mainly due to a morphological specificity of equine embryos that disturbs flows of cryoprotectant: the embryonic capsule. It is impossible to get free from this biological barrier so it is necessary to improve cryoprotectant penetration into the embryo.

The aim of this experiment was to compare a one-step addition of 10%-glycerol with a classical four-steps addition. Two groups of day 6.75 embryos ($n = 19$) treated as explained above were frozen and thawed in the same way. They were then transferred surgically in order to be recovered at 11 days.

In this experiment, the *in vivo* development did not show a difference of efficiency between the control group and the one-step group. Even though statistical validity is not confirmed, use of this one-step incorporation is discussed.

KEY WORDS : horse, embryos, freezing, cryoprotectant, glycerol.