

Cryoconservation des embryons des espèces domestiques

F. GUIGNOT

INRA, Unité Mixte de Recherche Physiologie, de la reproduction et des comportements, 37380 Nouzilly

Courriel : guignot@tours.inra.fr

Aujourd'hui, grâce aux énormes progrès réalisés, la cryoconservation des embryons fait partie des biotechnologies de pointe. Les avantages économiques, sanitaires et génétiques apportés par cette technique sont très importants pour les éleveurs et les sélectionneurs. En Europe, en 2003, plus de la moitié des transferts embryonnaires bovins se sont faits à partir d'embryons cryoconservés.

Les premières conservations d'embryons par le froid datent des années 70 (Whittingham *et al* 1972 : chez la souris ; Wilmut et Rowson 1973 : chez la vache). Un refroidissement lent (0,2° C/min) en présence de DMSO comme cryoprotecteur était utilisé, avant stockage des embryons dans l'azote liquide (- 196° C). Dans les années 80 se développe une nouvelle technique de cryoconservation, la vitrification, qui consiste à plonger très vite les embryons dans l'azote liquide (Rall et Fahy 1985, Scheffen *et al* 1986). A présent, une multitude de protocoles sont réalisés, allant de la congélation lente, à la vitrification traditionnelle ou ultra rapide, avec différents cryoprotecteurs organiques pénétrant dans les cellules ou non. Tous ces cryoprotecteurs ont pour but de préserver l'embryon de la formation de cristaux de glace intracellulaires pendant le refroidissement, de faciliter la déshydratation des cellules, de protéger les membranes cellulaires et d'éviter le phénomène de recristallisation lors du réchauffement de l'embryon avant transfert dans une femelle receveuse. Toutes les espèces, ainsi que les différents stades de développement embryonnaire ne sont pas égaux face à la cryoconservation en terme de taux de survie de l'embryon après décongélation. Le taux de survie des embryons après décongélation est également fonction de l'origine des embryons (production *in vivo* ou *in vitro*) et du fait qu'ils soient intacts, biopsiés ou clonés.

La cryoconservation des embryons a un intérêt économique et génétique non négligeable. Elle permet la sauvegarde des espèces et des races en voie d'extinction, le maintien et le stockage de la

biodiversité dans une cryobanque nationale, le transport de matériel génétique plus facilement que l'animal sur pied évitant ainsi la perte d'animaux importants génétiquement pendant le transport, réduisant les risques sanitaires et permettant une commercialisation plus facile et moins coûteuse d'animaux à forte valeur génétique. La cryoconservation permet également une régénération plus facile et plus rapide des lignées lors de maladies ou de catastrophes impliquant la disparition d'un troupeau entier. Enfin, c'est une technique qui a un avantage certain en terme de taux de survie après transfert par rapport à la cryoconservation des ovocytes, qui est loin de pouvoir rentrer dans des programmes de conservation de la diversification génétique car, pour l'instant, elle est encore au stade expérimental avec des résultats très limités et surtout très peu de données après transfert.

Dans un premier temps, le principe de la cryoconservation des embryons, avec les dommages engendrés et les moyens de protections existants seront exposés, puis seront abordées différentes techniques de cryoconservation, à savoir la congélation lente, la vitrification et la vitrification ultra rapide, ainsi que leurs avantages/inconvénients et leur application sur le terrain. Pour finir, les facteurs affectant l'efficacité de la cryoconservation seront abordés.

1 / Principe de la cryoconservation

La cryoconservation doit permettre le ralentissement, voire l'arrêt de tous les phénomènes biologiques ; à des

températures inférieures à - 150° C, les mouvements moléculaires sont très réduits et les réactions chimiques et enzymatiques sont inhibées : le temps cellulaire est suspendu. Cependant, à cette température, l'eau, constituant majeur de l'embryon, est sous forme solide. Le problème de la cryoconservation réside donc dans le fait d'atteindre des températures très basses et d'en revenir sans trop de dommages, c'est-à-dire de permettre à l'embryon, lors du réchauffement, de revenir à un état liquide viable.

1.1 / Les dommages engendrés

Il faut limiter au maximum la transformation de l'eau des cellules embryonnaires en cristaux de glace intracellulaire au cours du refroidissement, car au fur et à mesure que la température décroît, la taille des cristaux qui se forment augmente, ce qui présente un risque de lésion pour les membranes et les organites cellulaires, tels l'appareil de Golgi, les mitochondries, les lysosomes, ainsi qu'un risque de dénaturation du cytosquelette des cellules. La désorganisation des microfilaments et des microtubules du cytosquelette, notamment au moment de la compaction et à la formation du blastocoele où l'organisation du cytosquelette est plus complexe, peut altérer de façon critique les fonctions de la cellule.

Lors du refroidissement, les premiers cristaux de glace se forment dans le milieu extracellulaire, induisant une augmentation des sels dissous dans ce compartiment et une hypertonicité de celui-ci. Par osmose, l'eau des cellules embryonnaires va donc sortir dans le milieu extracellulaire. C'est l'effet

solution. Il présente un grand risque pour l'embryon, car une augmentation trop forte de la concentration des solutés intracellulaires entraînerait la modification de la structure tertiaire et le fonctionnement des protéines, et la mort cellulaire par effet de salage. De plus, il pourrait induire une trop forte contraction du volume embryonnaire. Certes, la membrane plasmique a une certaine résistance mécanique à l'étirement, variable d'ailleurs en fonction des espèces, mais à chaque déshydratation et réhydratation, le volume cellulaire est modifié, générant des stress mécaniques pour la membrane, et une modification trop rapide de la surface cellulaire entraînerait des ruptures irréversibles de celle-ci.

1.2 / Les protections contre le froid

Pour limiter ces phénomènes, la vitesse de refroidissement peut être modulée : dans un premier temps, elle doit être lente pour permettre à l'eau intracellulaire de sortir de l'embryon, puis, dans un deuxième temps, elle doit être plus rapide pour éviter une trop forte déshydratation des cellules qui serait néfaste à l'embryon. Quelle que soit la vitesse de refroidissement choisie, les embryons ne peuvent pas survivre à des températures inférieures à -20°C sans la présence de substances spécifiques, appelées « cryoprotecteurs ».

Les « cryoprotecteurs » sont des composés organiques qui pénètrent dans les cellules ; ce sont généralement des alcools de faible poids moléculaire comme le glycérol, le DMSO (diméthylsulfoxyde), l'éthylène glycol ou le propane-diol. Ils vont se substituer à une partie de l'eau intracellulaire, permettre ainsi une déshydratation partielle des cellules de l'embryon et limiter la formation de cristaux de glace intracellulaire. Ils réduisent également la vitesse de croissance de ces cristaux, abaissent la température de solidification de l'eau intracellulaire, tel un « antigel », et modifient la forme des cristaux de glace. Cependant, à fortes concentrations, ces composés sont toxiques pour les embryons. C'est pourquoi ils sont souvent associés par deux, ce qui permet, pour un même effet, de réduire la concentration finale de chaque cryoprotecteur, réduisant du même coup leurs effets toxiques respectifs. Les cryoprotecteurs sont également des composés organiques qui ne peuvent pas pénétrer dans les cellules, tels que les petits saccharides

comme le saccharose, le galactose ou encore le tréhalose. Ils ont un rôle osmotique très important, notamment lors du réchauffement, en favorisant la sortie des cryoprotecteurs. En maintenant une pression osmotique plus élevée dans le milieu extracellulaire, ils évitent une entrée massive d'eau dans les cellules lors du réchauffement.

Des macromolécules comme le PVP (polyvinylpyrrolidone), le Ficoll (polymères de saccharose) ou des protéines (BSA, FCS) sont également des cryoprotecteurs non pénétrants utilisés pour protéger les cellules embryonnaires. Ils permettent, *via* l'augmentation de la viscosité du milieu, la diminution de la rapidité des mouvements de l'eau et de la taille des cristaux de glace, ainsi que, *via* l'augmentation de la pression oncotique, la réduction de la quantité de cryoprotecteurs pénétrants nécessaires à une bonne cryoconservation.

Des cryoprotecteurs au sens large du terme sont également utilisés pour les embryons les plus sensibles : ce sont des agents protecteurs du cytosquelette comme la cytochalasine B. Ils permettent la désorganisation réversible du cytosquelette par dépolymérisation des filaments d'actine et de tubuline avant le refroidissement des embryons, ce qui assure une meilleure protection du cytosquelette contre les dommages que peut engendrer le froid et qui eux sont irréversibles.

2 / Les différentes techniques de cryoconservation

2.1 / Congélation lente

a) Principe

La congélation lente, comme son nom l'indique, est une technique « lente » de cryoconservation dont le principe est l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon. Elle est d'ailleurs aussi appelée congélation « à l'équilibre ». Les cryoprotecteurs utilisés sont le glycérol, l'éthylène glycol, le DMSO ou encore le propane-diol, à la concentration de 10 % environ, ce qui équivaut à 1 à 1,5 M. L'incorporation des cryoprotecteurs a tendance à se faire en une seule étape actuellement, mais elle peut se faire en plusieurs étapes : les embryons sont alors déposés dans différents bains de concentrations croissantes en cryoprotecteurs (ex. : 0,5, 1 puis 1,5 M, avec environ 5 minutes dans chaque bain), afin d'éviter les

chocs osmotiques importants. Les embryons sont ensuite conditionnés dans des paillettes de 0,25 ml (figure 1.a), qui vont être réfrigérées suivant un protocole précis, nécessitant un appareil de congélation programmable pour régler les différents paliers de refroidissement successifs. La température descend tout d'abord jusqu'à -7°C à la vitesse de 1 à $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ pour les appareils programmables (congélateur à circulation d'eau notamment) (figure 2) ; pour les autres appareils (congélateur à bain d'alcool et à azote liquide), la descente jusqu'à -7°C n'est pas programmable, les paillettes sont déposées dans l'appareil de congélation préalablement refroidi à -7°C . Dans tous les cas, les paillettes sont maintenues à -7°C pendant 5 minutes environ, avant l'induction de la cristallisation (« seeding ») par refroidissement localisé de celles-ci à l'aide d'une pince refroidie dans l'azote ou grâce à un système incorporé à l'appareil de congélation. La cristallisation doit être induite par l'opérateur avant qu'elle ne se fasse de manière spontanée afin d'éviter une congélation des cellules à une température trop basse qui entraînerait une hausse brutale de la température (pic de surfusion) dans la paillette et provoquerait par conséquent des dégâts cellulaires. La température de « seeding » dépend du point de congélation de la solution, donc elle peut varier en fonction des cryoprotecteurs utilisés (-6°C à -7°C). De -7°C à 30°C , la température descend très lentement (0,1 à $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) pour permettre la déshydratation des embryons. En fonction des protocoles, l'arrêt de la descente progressive de température se fait entre -25°C et -35°C . Les paillettes sont ensuite rapidement plongées dans l'azote liquide à -196°C , pour éviter une déshydratation trop poussée qui serait létale pour l'embryon. Dans ces conditions de cryoconservation, la déshydratation des cellules embryonnaires n'est donc que partielle : il reste une certaine quantité d'eau intracellulaire qui se transforme en glace. Pour empêcher le phénomène de recristallisation de cette eau au dégel, il faut décongeler rapidement les paillettes. Elles sont donc plongées rapidement dans un bain-marie à une température comprise entre 22 et 37°C selon les protocoles : la vitesse de réchauffement est de l'ordre de $2\ 500^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Les cryoprotecteurs sont soit retirés en une seule étape, soit par paliers successifs de concentrations décroissantes en cryoprotecteurs, couplés ou non avec un gradient décroissant de saccharose. Les

Figure 1. Montage des embryons en paillete avant refroidissement.

Fig 1.a Congélation lente (paillete de 0,25 mL)

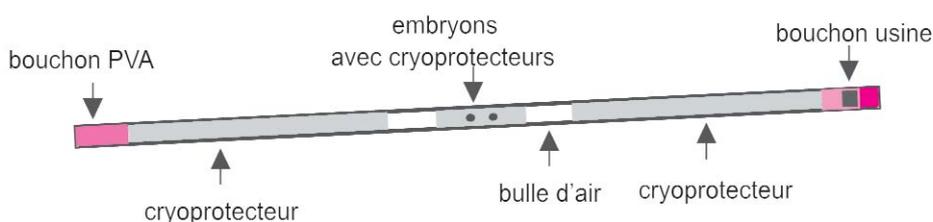


Fig 1.b Vitrification (paillete de 0,25 mL) ou Congélation lente avec transfert direct

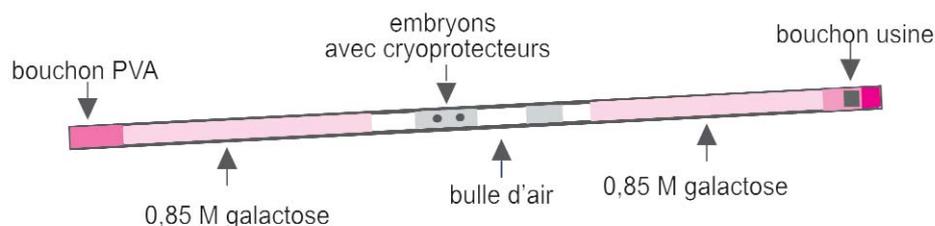
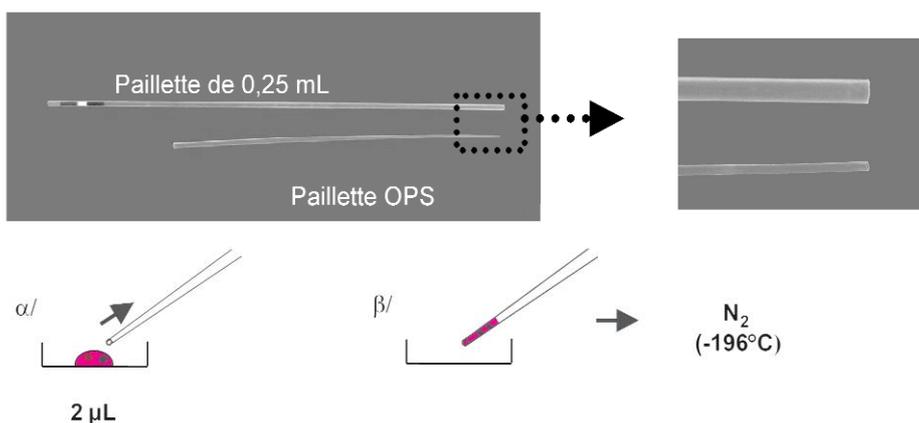


Fig 1.c OPS (paillete de 0,25 mL)

PVA : Polyvinylalcool ; OPS : open pulled straw ; N₂ : azote liquide.

α/ : Une goutte de 2µl de cryoprotecteurs avec les embryons est déposée au fond d'une boîte.

β/ : La goutte monte par capillarité au bout de la paillete, puis celle-ci est directement plongée dans l'azote liquide.

embryons peuvent alors être transférés dans une femelle receveuse (transfert traditionnel). Dans le cas des transferts dits « directs », les cryoprotecteurs ne sont même pas retirés et le contenu entier de la paillete est alors introduit dans la corne utérine de la femelle receveuse. Les techniques de transfert direct peuvent soit faire appel à un cryoprotecteur à diffusion très rapide comme l'éthylène glycol, soit utiliser un dilueur inclus dans la paillete. L'embryon est alors emprisonné dans un segment de solution cryoprotectrice au centre de la paillete, séparé par des bulles d'air des extrémités contenant le dilueur (ex. : du saccharose ou du galactose, figure 1.b).

b) Avantages / inconvénients

Cette technique est facile à mettre en œuvre. Les temps dans chacun des

bains sont relativement longs, ce qui permet tranquillement à une personne peu expérimentée de pratiquer cette méthode. La possibilité de faire des transferts directs évite d'avoir recours à une équipe de spécialistes pour faire le transfert, et les taux de mises bas sont aussi bons qu'après retrait des cryoprotecteurs (Baril *et al* 2001a, Martinez *et al* 2002a).

Les cryoprotecteurs utilisés sont peu toxiques pour l'embryon et leur concentration maximale, dans le dernier bain avant refroidissement, est faible (1,5 M c'est-à-dire 8,5 % pour l'éthylène glycol).

Cependant, cette technique est très coûteuse en temps comme en argent. Pour le refroidissement, il faut néces-

sairement faire l'achat d'un congélateur programmable, voire de deux s'il y a beaucoup d'embryons à conserver. Un cycle de refroidissement ne peut être lancé que lorsqu'un nombre suffisant d'embryons a été collecté, ce qui fait que les premiers embryons collectés attendent avant d'être refroidis. D'autre part, cette technique ne convient pas à toutes les espèces, notamment à l'espèce porcine, et à toutes les catégories d'embryons (stade de développement jeune, embryon produits *in vitro*, embryons biopsiés...), à cause notamment de la forte sensibilité de ces embryons à des températures comprises entre + 15° C et - 5° C (chilling injury) (Pollard et Leibo 1994).

c) Utilisation sur le terrain

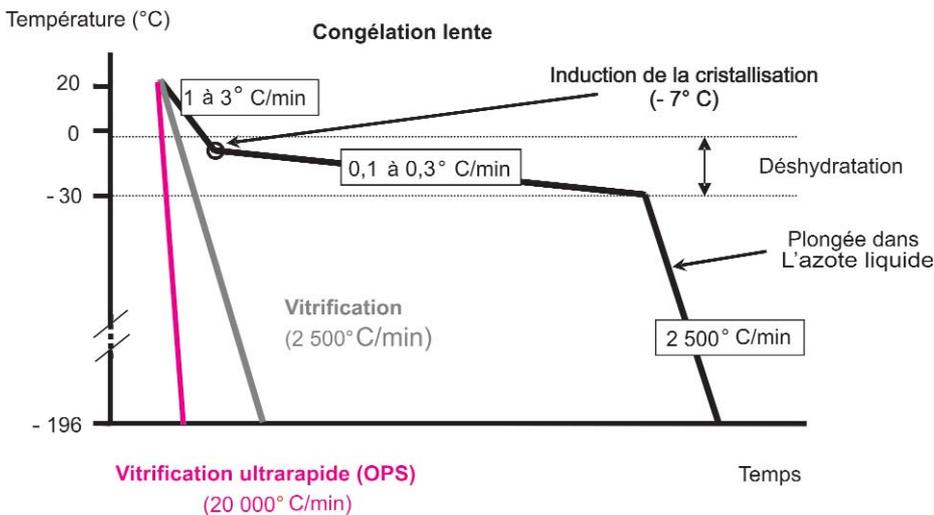
C'est la technique classiquement utilisée sur le terrain pour des collectes et transferts d'embryons bovins, ovins et caprins produits *in vivo*. Elles donnent des résultats très reproductibles et qui sont à peine inférieurs à ceux obtenus après transfert des embryons frais, environ 10 à 15 % de moins (Niemann 1991, Palasz et Mapletoft 1996, Hasler 2001). Beaucoup de travaux d'optimisation de ces techniques de congélation lente ayant été publiés, il semble que peu d'améliorations supplémentaires puissent être attendues dans le futur.

2.2 / Vitrification

a) Principe

La vitrification est une technique de « non équilibre » à la différence de la congélation lente ; elle permet d'éviter au maximum la formation des cristaux de glace au cours du refroidissement en transformant la phase liquide du cytoplasme cellulaire en phase solide amorphe, encore appelée « état vitreux ». Ceci est possible en utilisant des concentrations très élevées en cryoprotecteurs (6 à 7,5 M), induisant une très forte viscosité du milieu, et en appliquant une vitesse de refroidissement et réchauffement très rapide. Les embryons sont déposés dans différents bains à concentration croissante en cryoprotecteurs (ex. : 1,5, 4 puis 7,5 M avec 5 minutes dans les deux premiers bains et seulement 30 secondes dans le dernier), afin de limiter les chocs osmotiques liés aux très fortes concentrations en cryoprotecteurs utilisées dans cette technique, l'eau passant en effet beaucoup plus vite les membranes que les cryoprotecteurs, même de petite taille. Les embryons sont ensuite conditionnés dans des paillettes, avec de part

Figure 2. Vitesse de refroidissement des embryons en fonction de la technique de cryoconservation.



et d'autre de l'embryon, des colonnes de solution de dilution contenant des sucres (galactose, saccharose, tréhalose...) (figure 1.b), puis immédiatement et rapidement plongés dans l'azote liquide (refroidissement de l'ordre de 2 500° C/min, en paillette de 0,25 ml ; figure 2). Avec cette technique, la déshydratation et la rétraction des cellules sont plus importantes, comparées à la technique de congélation lente. Au dégel, comme pour la congélation lente, les paillettes sont rapidement plongées dans un bain-marie à 25 - 30° C. Le contenu de la paillette est vidé et les cryoprotecteurs sont éliminés de l'embryon par diffusion passive, comme pour la congélation lente, grâce à la présence de sucres qui augmentent la pression osmotique du milieu extracellulaire. Les embryons sont ensuite rincés et transférés dans une femelle receveuse. Des transferts directs peuvent également être réalisés, sans retrait des cryoprotecteurs, avec des taux de gestation équivalents à ceux obtenus avec du transfert traditionnel dans les espèces ovine et caprine (Baril *et al* 2001a, 2001b).

b) Avantages / inconvénients

Cette technique est très rapide, elle ne nécessite pas d'équipements coûteux, et les embryons peuvent être vitrifiés au fur et à mesure de leur collecte, donc ils n'attendent pas contrairement à la technique de congélation lente. C'est une technique de terrain par excellence, nécessitant très peu de matériel.

La rapidité de refroidissement permet d'éviter les chocs thermiques qui existent lors du passage des cellules à des températures basses alors qu'elles sont encore à l'état liquide. Le passage direct de l'état liquide à l'état amorphe,

sans formation de cristaux de glace, est un point très important pour la survie des embryons après réchauffement, puisque ce sont ces cristaux de glace qui sont responsables de lésions membranaires des cellules et des organelles.

Ces techniques de refroidissement très rapide permettent aussi de diminuer les dommages liés au refroidissement progressif des cellules (chilling injury), et ainsi permettre à des espèces ou à des embryons plus sensibles au froid (produits *in vitro*, issus de clonage, biopsiés...) d'être tout de même cryoconservés (Massip *et al* 1995, Vajta 2000).

Cependant, la nécessité d'utiliser de très fortes concentrations en cryoprotecteurs est hautement toxique pour les embryons. Le temps de passage dans chacun des bains, surtout le dernier est très critique : la déshydratation de l'embryon doit s'arrêter à un temps précis, dépendant de la vitesse de diffusion des cryoprotecteurs et de leur concentration, ainsi que de la température d'incubation. Il faut donc respecter ces temps, d'où la nécessité d'avoir une main un peu experte pour réaliser cette technique.

c) Utilisation sur le terrain

Cette technique est classiquement utilisée dans des études expérimentales de transfert. Sur le terrain, Van Wagendonk de Leeuw *et al* (1997) ont montré, sur un grand nombre de vaches, que la vitrification donnait des taux de mises bas aussi importants que la congélation lente (44,5 % n = 393 versus 45,1 % n = 335). Cependant, comme la congélation lente donne des résultats satisfaisants sur le terrain et est depuis des années entrée dans la

pratique, et comme la vitrification n'offre pas de gain supplémentaire en terme de taux de réussite, cette dernière reste tout de même peu utilisée.

2.3 / Vitrification rapide (OPS) et ultra rapide

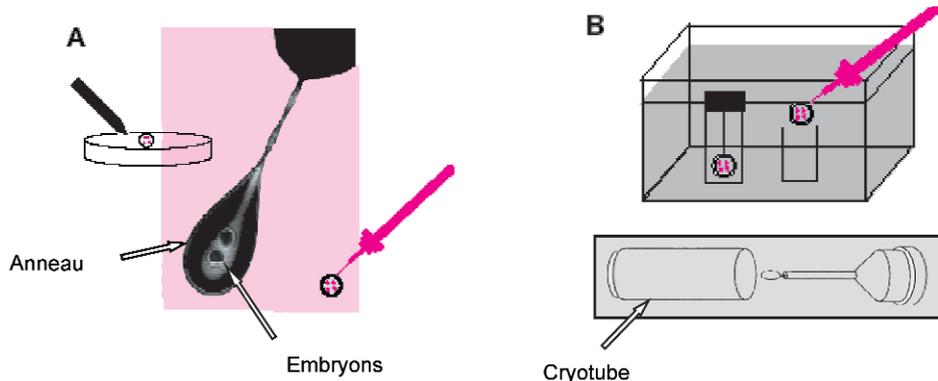
a) Principe

Ces techniques de vitrification reposent sur des vitesses de refroidissement et de réchauffement encore plus rapides, de l'ordre de 20 000° C/min. Ceci est possible grâce au faible volume vitrifié (seulement 2 µl pour l'OPS) et à la faible épaisseur des parois des paillettes dans lesquelles les embryons montent par capillarité : ce sont des paillettes classiques de 0,25 ml qui ont été étirées : Open Pulled Straw, d'où le nom de la technique d'OPS (Vajta *et al* 1997a, figure 1.c). La vitesse de refroidissement peut encore être augmentée en utilisant des paillettes encore plus fines (technique de Super OPS décrite par Isachenko *et al* 2003) ou en plongeant les paillettes dans de l'azote refroidi à une température inférieure à sa température d'évaporation, ce qui évite la formation de vapeurs d'azote ayant un effet d'isolant thermique autour de la paillette. Pour ce faire, l'azote est mis sous vide et descend ainsi à - 210° C (Arav 1998) ; la vitesse de refroidissement est alors de l'ordre de 25 000 à 130 000° C/min pour une paillette de type OPS. Ces paillettes étirées peuvent être fermées afin d'éviter toute contamination lors du stockage dans les containers d'azote.

D'autres techniques, faisant appel à d'autres supports que les paillettes en plastique sont également utilisées : les embryons sont refroidis sur des plaques métalliques, des grilles de microscopie électronique, des pipettes en verre ou encore sur des anneaux métalliques au centre duquel se forme un film de solution protectrice, comme une bulle de savon, emprisonnant les embryons (technique des cryoloops décrite par Lane *et al* 1999, figure 3). La vitesse de vitrification est encore plus rapide du fait de l'absence d'obstacle entre l'azote et l'embryon.

b) Avantages / inconvénients

L'OPS est la technique qui a permis à l'embryon de porc d'être correctement cryoconservé (Berthelot *et al* 2000, 2002), ainsi qu'à l'embryon de hamster (Lane *et al* 1999). Cette technique a également donné des résultats encourageants pour la cryoconservation d'ovocytes chez le bovin (Vajta *et al* 1998).

Figure 3. Cryoconservation sur «cryoloop» (Lane et al 1999).

A : Une fois déposés dans le milieu avec les cryoprotecteurs, les embryons sont «emprisonnés» au centre d'un anneau où se forme un film de solution protectrice.

B : L'anneau est ensuite plongé directement dans l'azote liquide et stocké dans un cryotube.

Cependant, ces techniques de refroidissement ultra rapide nécessitent des mains encore plus expertes que pour la vitrification traditionnelle et le stockage des embryons vitrifiés en paillettes OPS, en gouttes ou sur cryoloops reste quelque peu problématique. D'autre part, les paillettes d'OPS ne sont généralement pas scellées car lorsqu'elles le sont, elles risquent d'exploser au dégel. Les risques de contamination des embryons au contact de l'azote liquide et pendant leur stockage ne sont donc pas nuls.

c) Utilisation sur le terrain

Ces techniques sont loin d'être utilisées sur le terrain. Par contre, elles sont

pratiquées en laboratoire, en routine, sur des embryons bovins et ovins, notamment, afin de tester différentes conditions de production *in vitro* d'embryons (Rizos *et al* 2001), également pour des embryons issus de clonage (Peura *et al* 2001).

3 / Facteurs affectant l'efficacité de la cryoconservation

Plusieurs facteurs inhérents à la qualité de l'embryon modifient les taux de survie après gel/dégel de celui-ci. Ce

sont, l'origine de l'embryon, son stade de développement au moment du refroidissement et l'espèce dont il est issu (tableau 1 A et B).

3.1 / Origine des embryons (production *in vivo* ou *in vitro*)

Dans l'espèce bovine, le taux de mise bas à partir d'embryons produits *in vivo*, et congelés, n'est que légèrement inférieur à celui obtenu après transfert des embryons à l'état frais (Niemann 1991, Hasler 2001, Martinez *et al* 2002b). Il en est de même chez la brebis, 50 % de survie embryonnaire après transfert d'embryons cryoconservés sont obtenus contre 60 % avec des embryons frais (Baril *et al* 2001b). Pour les embryons produits *in vitro*, les taux sont bien plus faibles. Chez la brebis, Dattena *et al* (2004) ont obtenu 18-22 % de survie embryonnaire après transfert d'embryons produits *in vitro* et vitrifiés, *versus* 60-63 % pour des embryons produits *in vivo* et vitrifiés. Chez la chèvre comme chez la vache, seulement 30 % de survie embryonnaire ont été obtenus après transfert d'embryons produits *in vitro* et vitrifiés (Vajta *et al* 1997b, Lane *et al* 1998, Traldi 2000) et 42 % après congélation lente (Hasler *et al* 1995).

Les embryons produits *in vitro* diffèrent énormément de ceux produits *in vitro* de par leur structure cellulaire

Tableau 1. Taux de survie embryonnaire après transfert des embryons cryoconservés.

A/ Origine des embryons

	<i>In vivo</i> %	<i>In vitro</i> %	<i>In vivo</i> (frais) %
Bovin	56-69 (Hasler J.F. 2001) <i>C. lente</i> 50 (Martinez <i>et al</i> 2002b) <i>Vitrif.</i>	42 (Hasler <i>et al</i> 1995) <i>C. lente</i> 30 (Vajta <i>et al</i> 1997b) <i>Vitrif.</i>	68-77 (Hasler J.F. 2001) 65 (Martinez <i>et al</i> 2002b)
Ovin	50 (Baril <i>et al</i> 2001b) <i>Vitrif.</i> 60-63 (Dattena <i>et al</i> 2004) <i>OPS / Vitrif.</i>	24 (Ptak <i>et al</i> 1999) <i>Vitrif.</i> 18-22 (Dattena <i>et al</i> 2004) <i>Vitrif. / OPS</i>	60 (Baril <i>et al</i> 2001b)
Caprin	40 (Traldi A .S. 2000) <i>Vitrif.</i> 39-55 (Baril <i>et al</i> 2001a) <i>Vitrif. / C. lente</i>	30 (Traldi A.S. 2000) <i>Vitrif.</i>	70 (Cognie <i>et al</i> 2001)

B/ Stade de développement embryonnaire

	Morula %	Blastocyste %	
Bovin	18	40	(Martinez <i>et al</i> 2002a) <i>C. lente</i>
Porcin	13	32	(Berthelot <i>et al</i> 2001, 2002) <i>C. lente</i>
Homme	29	8	(Vanderzwalmen <i>et al</i> 1999) <i>Vitrif.</i>
Murin	61	41	(Han <i>et al</i> 2003) <i>Vitrif.</i>
Equin	Problème dû à la présence de la capsule à partir du stade jeune blastocyste		

C. lente : congélation lente ; *Vitrif.* : vitrification ; *OPS* : Open Pulled Straw.

(Crosier *et al* 2000, 2001, Fair *et al* 2001), leur métabolisme (Khurana et Niemann 2000), et cette différence est dépendante des conditions de culture *in vitro* appliquées. Les embryons produits *in vitro* ont notamment un espace périvitellin plus grand, une plus grande richesse en vacuole, un nombre réduit de blastomères et de mitochondries, des jonctions entre les cellules trophoblastiques moins nombreuses et une densité plus faible due à un rapport lipides / protéines plus élevé comparés aux embryons produits *in vivo* (Iwasaki *et al* 1990, Leibo et Loskutoff 1993, Abd El Razek *et al* 2000, Crosier *et al* 2001, Fair *et al* 2001), ce qui peut expliquer leur forte sensibilité à la congélation. En effet, par exemple, les désordres du métabolisme lipidique induits par la culture *in vitro* peuvent entraîner des changements de la composition lipidique des membranes, et donc des différences de perméabilité aux cryoprotecteurs, ainsi que des changements de stabilité et de résistance membranaires. Certaines conditions de culture *in vitro* permettent néanmoins d'obtenir des embryons de qualité quasi équivalente à celle des embryons produits *in vivo*, pour ce qui est de leur résistance au froid : par exemple, les cultures d'embryons *in vitro* sur tapis cellulaires (Massip *et al* 1993, Rizo *et al* 2001), ou encore les cultures d'embryons en absence de sérum (Dinnyes *et al* 1996, Abe *et al* 2002, Hoshi 2003), substance connue pour augmenter le taux de triglycérides dans l'embryon par rapport à un embryon produit *in vivo* (Ferguson et Leese 1999). De même, la culture, du stade deux cellules jusqu'au stade blastocyste dans des oviductes de brebis, d'embryons bovins issus de fécondation *in vitro* permet d'obtenir des embryons presque aussi résistants au froid que les embryons produits *in vivo* (Enright *et al* 2000, Rizo *et al* 2002). L'ajout d'agents antioxydants comme le β -mercaptoethanol protégeant l'embryon du stress oxydatif lié à la culture *in vitro* (Feugang *et al* 2004) ou l'utilisation de milieux séquentiels mieux adaptés aux besoins évolutifs de l'embryon pourraient également améliorer leur résistance.

3.2 / Stade de développement

Les stades avancés de développement embryonnaire tolèrent généralement mieux la cryoconservation. Dans l'espèce bovine, 40 % de mise bas sont obtenus à partir de blastocystes produits *in vivo* et congelés contre seulement 18 % à partir de morulae (Martinez *et al* 2002a). Des résultats légèrement inférieurs sont obtenus à

partir d'embryons produits *in vitro* et vitrifiés : 32 % de gestation à J 90 avec des blastocystes contre 11 % avec des morulae (Pugh *et al* 2000). Chez le porc, 32 % de mise bas sont obtenus avec des embryons *in vivo* vitrifiés au stade blastocyste contre seulement 13 % au stade morula (Berthelot *et al* 2001, 2002). Il en est de même dans l'espèce caprine (Chemineau *et al* 1986, Li *et al* 1990). Par contre, dans l'espèce humaine, comme chez la souris, les embryons plus jeunes sont plus résistants au froid (Vanderzwalmen *et al* 1999, Mukaida *et al* 2003) : des taux de grossesse de 29 et 25 % ont été obtenus après transfert d'embryons vitrifiés, respectivement, au stade morula à J 4 et jeunes blastocystes à J 5, alors que seulement 8 % ont été obtenus à partir du stade blastocyste à J 6. La même observation est faite chez la ratte avec 61 % de survie embryonnaire après transfert d'embryons vitrifiés au stade morula contre 41 % au stade blastocyste (Han *et al* 2003). Il semble que la cavité blastocœlique et la grande quantité de liquide qu'elle renferme soient un frein à la bonne cryoconservation de l'embryon humain. Après contraction artificielle du blastocœle, le taux de survie embryonnaire des blastocystes et blastocystes expansés à J 5 est de 20,5 % contre seulement 4,5 % pour des blastocystes intacts (Vanderzwalmen *et al* 2002).

Le problème est un peu différent dans l'espèce équine à cause de l'apparition d'une capsule autour des embryons, qui est synthétisée par une coopération entre les cellules du trophoblaste et les cellules de l'endomètre, et ceci quelques heures après l'arrivée de l'embryon dans l'utérus. Seuls les embryons qui ont atteint le stade blastocyste ont donc une capsule. De nature glycoprotéique, la capsule a une structure très compacte et très stable qui limite la diffusion des cryoprotecteurs jusqu'au centre de l'embryon et rend la cryoconservation des blastocystes très difficile (Oriol *et al* 1993, Legrand *et al* 2000, Maclellan *et al* 2002). Par opposition, les plus jeunes embryons, au stade morula et très jeune blastocyste, de taille inférieure à 300 μ m et qui eux n'ont pas de capsule, peuvent être cryoconservés avec plus de succès (Hochi *et al* 1995).

3.3 / Espèces

Les travaux de recherche sur la cryoconservation de l'embryon bovin sont de loin les plus nombreux (Vajta 2000, Massip 2001). Cette biotechnologie est largement employée sur le terrain, à

partir d'embryons produits *in vivo*, avec 54,6 % des transferts réalisés en Europe en 2003 (n = 98 918), contre seulement 8,5 % pour des embryons produits *in vitro*. Pour ces derniers, même les nouvelles techniques ultra rapides de cryoconservation ne permettent pas de rattraper le taux de survie d'embryons produits *in vivo* (voir ci-dessus) : le souci vient de la qualité de l'embryon produit plus que de l'inadéquation de la technique de conservation.

Chez la brebis, la vitrification et la congélation lente d'embryons produits *in vivo* donnent de très bons résultats après transfert, de l'ordre de 50 à 60 % de mise bas (Mermillod *et al* 1999, Baril *et al* 2001b, Dattena *et al* 2004). Moins de travaux sont disponibles chez la chèvre ; la vitrification semble toutefois donner de moins bons résultats que la congélation lente dans cette espèce, 39 % *versus* 55 % de mise bas (Baril *et al* 2001b). Chez les ovins comme chez les caprins, grâce à la technique ultra rapide de vitrification (OPS), 55-64 % de survie embryonnaire ont été obtenus avec des embryons produits *in vivo* (Branca *et al* 2000, Dattena *et al* 2000, 2004, El Gayar *et al* 2001). Ces résultats restent toutefois à confirmer sur de plus grands effectifs chez les caprins. Pour ce qui est des embryons produits *in vitro*, les données de survie après transfert sont rares ; bien que plus faibles que celles obtenues avec des embryons produits *in vivo*, elles sont encourageantes (Traldi 2000 : 30 %, Ptak *et al* 1999 : 24 %, Dattena *et al* 2004 : 22 %). Même si des banques d'embryons caprins et ovins existent en France, aucun commerce n'en est fait actuellement. Par contre, l'Afrique du Sud, la Nouvelle Zélande et l'Australie en font le commerce avec l'Amérique du Sud et le Canada, avec 50 % de taux de survie embryonnaire pour les brebis et un peu moins pour les chèvres (Holm *et al* 1999, Evans *et al* 1997).

Les embryons de porcs sont restés longtemps sans pouvoir être cryoconservés, à cause notamment de la grande quantité de lipides qu'ils contiennent. Des essais de délipidations des embryons avant cryoconservation ont permis d'augmenter le taux de survie après transfert (Nagashima *et al* 1995 : 3 porcelets nés sur 181 embryons transférés), tout comme la dépolymérisation du cytosquelette par la cytochalasine B avant cryoconservation (Dobrinsky *et al* 2000 : 13 % de mise bas, n = 224). Avec la technique d'OPS, la cryoconservation de l'embryon por-

cin produit *in vivo* a pris son envol (Vajta *et al* 1997c, Berthelot *et al* 2001, 2002 : 32 % de survie à partir de blastocystes, n = 200). En avril 2004, une entreprise française spécialisée en génétique porcine a réussi à faire naître les premiers porcelets commerciaux OPS (Devos 2004), ce qui répond à l'attente de l'ensemble des professionnels de la génétique porcine qui désirent depuis longtemps se diriger vers cette technologie, vu les coûts de transport d'animaux sur pied.

Dans l'espèce équine, le développement de la cryoconservation des embryons a pris du retard par rapport à l'espèce bovine, s'expliquant par la faible disponibilité d'embryons surnuméraires nécessaires à la mise au point des techniques ainsi que par la présence d'une capsule limitant l'entrée des cryoprotecteurs dans l'embryon (voir ci-dessus). Le premier poulain né après transfert d'embryons congelés date des années 80 (Yamamoto *et al* 1982). Depuis, différents protocoles de congélation lente, ou même de vitrification,

ont été testés, mais seules 3 publications mentionnent la naissance de poulains (Czlonkowska *et al* 1985, Huhtinen *et al* 1997, Ulrich et Nowshari 2002). Alors que Lascombes et Pashen (2000) ont obtenu 54 % de gestation à 60 jours à partir de 44 embryons équins transférés dans un programme commercial de transfert, une compagnie commerciale canadienne propose ce service et annonce 72 % de gestation à J 42 (Vullers 2003) ; par contre, en France, aucune commercialisation d'embryons équins cryoconservés n'est proposée.

Conclusion

La cryoconservation des embryons est une technique qui a fait d'énormes progrès depuis les années 70, au cours desquelles ont été rapportés les premiers succès de congélation d'embryons de mammifères domestiques. Elle s'est diversifiée en plusieurs méthodes, alliant la rapidité de la congélation et la simplicité d'exécution.

Avec ces nouvelles méthodes, des espèces dont les embryons n'avaient pas pu être cryoconservés, ont pu l'être. La vitrification traditionnelle, et plus encore la vitrification ultra rapide, ont révolutionné le domaine de la cryoconservation et ont ouvert la porte à la cryoconservation des ovocytes. Il n'empêche que sur le terrain, la méthode traditionnellement appliquée, notamment dans les espèces bovine et ovine, reste la congélation lente, alors que la vitrification donne d'aussi bons taux de survie embryonnaire. Cependant, même si cette dernière a tous les avantages, la multiplicité des protocoles de vitrification, et surtout la rigueur et l'expertise nécessaires pour réussir cette technique semblent être un frein à son application massive sur le terrain. A l'heure actuelle, le rôle de la vitrification n'est donc pas dans le remplacement de la congélation lente, mais dans l'apport d'une solution technique pour des espèces ou des qualités d'embryons pour lesquelles la congélation lente n'a pas donné de résultats satisfaisants.

Références

- Abd E.I., Razek I.M., Charpigny G., Kodja S., Marquent le Guienne B., Mermillod P., Guyader-Joly C., Humblot P., 2000. Differences in lipid composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 53, 346.
- Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H., 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 57-66.
- Arav A. 1998. Method for cryopreservation of biological samples, US Patent, 5, 715, 686.
- Baril G., Cognie Y., Pougard J.L., Leboeuf B., Traldi A.L., Guignot F., Beckers J.F., Mermillod P., 2001a. Amélioration des méthodes de cryoconservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Renc. Rech. Rum.*, 8, 365-368.
- Baril G., Traldi A.L., Cognie Y., Leboeuf B., Beckers J.F., Mermillod P., 2001b. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56, 299-305.
- Berthelot F., Martinat-Botté F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M., 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. *Cryobiology*, 41, 116-124.
- Berthelot F., Martinat-Botté F., Perreau C., Terqui M., 2001. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reprod. Dev.*, 41, 267-272.
- Berthelot F., Martinat-Botté F., Perreau C., Locatelli A., Manceau P., Venturi E., Terqui M., 2002. The use of an appropriate vitrification medium allows development of 30 % of cryopreserved blastocysts and their birth as live piglets. *Pig News Inf.*, 23, 103-108.
- Branca A., Gallus M., Dattena M., Cappai P., 2000. Preliminary study of vitrification of goats embryos at different stage of development. 7th International Conference on Goats, Tours-Poitiers, France, 1032.
- Chemineau P., Procureur R., Cognie Y., Lefèvre P.C., Locatelli A., Chupin D., 1986. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology*, 26, 279-290.
- Cognie Y., Poulin N., Baril G., Guignot F., Beckers J.F., Mermillod P., 2001. Embryo survival after transfer of *in vitro* and *in vivo* produced goat embryos. 17^e Colloque Scientifique de l'AETE, Lyon, 110.
- Crosier A.E., Farin P.W., Dykstra M.J., Alexander J.E., Farin C.E., 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 62, 1677-1684.
- Crosier A.E., Farin P.W., Dykstra M.J., Alexander J.E., Farin C.E., 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 64, 1375-1385.
- Czlonkowska M., Boyle M.S., Allen W.R., 1985. Deep freezing of horse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 75, 485-490.
- Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B., Cappai P., 2000. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53, 1511-1519.
- Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B., Cappai P., 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts *in vitro* produced and *in vivo* derived. *Theriogenology*, 62, 481-493.
- Devos N., 2004. Des porcelets issus d'embryons congelés sont nés pour la première fois en France. *La Semaine Vétérinaire*, 1152, 54.
- Dinnyes A., Carolan C., Lonergan P., Massip A., Mermillod P., 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology*, 46, 1425-1439.
- Dobrinsky J.R., Pursel V.G., Long C.R., Johnson L.A., 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.*, 62, 564-570.
- EI-Gayar M., Holm P., Holtz W., 2001. Successful transfer of vitrified goat blastocysts with the open pulled straw (OPS). *Theriogenology*, 55, 305.
- Enright B.P., Lonergan P., Dinnyes A., Fair T., Ward F.A., Yang X., Boland M.P., 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo* : implication for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54, 259-673.
- Evans G., Faul A., Bielanski A., Renwick S., Van Derlinden I., 1997. Risk analysis and international trade principles applied to the importa-

tion into Canada of caprine embryos from South Africa. *Rev. Sci. Tech.*, 16, 265-270.

Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cottell D.C., Hyttel P., Ward F.A., Boland M.P., 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation : effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.*, 58, 186-195.

Ferguson E.M., Leese H.J., 1999. Triglycerides content of bovine oocytes and oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 116, 373-378.

Feugang J.M., de Roover R., Moens A., Leonard S., Dessy F., Donnay I., 2004. Addition of β -mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, 61, 71-90.

Han M.S., Niwa K., Kasai M., 2003. Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, 59, 1851-1863.

Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.O., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E., Trimmer S.A., 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43, 141-152.

Hasler J.F., 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401-1415.

Hochi S., Fujimoto T., Oguri N., 1995. Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 113-117.

Holm P., Petersen B.A., Hepburn J., Krogh K., Dagnaes-Hansen F., Callensen H., 1999. Transfer of Angora goat embryos imported into Denmark from New Zealand under quarantine conditions. *Theriogenology*, 33, 251.

Hoshi H., 2003. *In vitro* bovine embryos and their application in embryo transfer. *Theriogenology*, 59, 675-685.

Huhtinen M., Lagneaux D., Koskinen E., Palmer E., 1997. The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos. *Equine Vet. J. suppl.*, 25, 94-97.

Isachenko V., Folch J., Isachenko E., Nawroth F., Krivokharchenko A., Vajta G., Dattena M., Alabart J.L., 2003. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using identical protocol. *Theriogenology*, 60, 445-452.

Iwasaki S., Yoshida N., Ushijima H., Watanabe S., Nakahara T., 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 279-284.

Khurana N.K., Niemann H., 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 62, 847-856.

Lascombes F.A., Pashen R.L., 2000. Results from embryo freezing and post ovulation breeding in a commercial embryo transfer programme. Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Havemeyer Foundation Monogr ser., 3, 95-96.

Lane M.W., Ahern T.J., Lewis I.M., Gardner D.K., Peura T.T., 1998. Cryopreservation and

direct transfer of *in vitro* produced bovine embryos : a comparison between vitrification and slow-freezing. *Theriogenology*, 49, 170.

Lane M., Bavister B.D., Lyons E.A., Forest K.T., 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature Biotech.*, 17, 1234-1236.

Legrand E., Krawiecki M., Tainturier D., Cornière P., Delajarraud H., Bruyas J.F., 2000. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos ? Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Havemeyer Foundation Monogr. Ser., 3, 62-65.

Leibo S.P., Loskutoff M., 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39, 81-94.

Li R., Cameron A.W.N., Batt P.A., Trounson A.O., 1990. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2, 345-350.

MacLellan L.J., Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Scoggin C.F., Bruemmer J.E., Squires E.I., 2002. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology*, 58, 911-919.

Martinez A.G., Brogliatti G.M., Valcarcel A., de las Heras M.A., 2002a. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos : a field trial. *Theriogenology*, 58, 963-972.

Martinez A.G., Valcarcel A., de las Heras M.A., de Matos D.G., Furnus C., Brogliatti G., 2002b. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos : *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Anim. Reprod. Sci.*, 73, 11-21.

Massip A., 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 49-55.

Massip A., Mermillod P., Wils C., Dessy F., 1993. Effects of dilution and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 97, 65-69.

Massip A., Mermillod P., Dinnyes A., 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos : implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 10, 103-108.

Mermillod P., Traldi A.L., Baril G., Beckers J.F., Massip A., Cognié Y., 1999. A vitrification method for direct transfer of sheep embryos. 15e Colloque Scientifique de l'AETE, Lyon, 212.

Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Oka C., Kasai M., Takahashi K., 2003. Vitrification of human blastocysts using cryoloops : clinical outcome of 223 cycles. *Hum. Reprod.*, 18, 384-391.

Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J., Grupen C.G., Nottle M.B., 1995. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*, 374, 416.

Niemann H., 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock : current status and research needs. *Theriogenology*, 35, 109-124.

Oriol J.G., Betteridge K.J., Clarke A.J., Sharom F.J., 1993. Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 255-265.

Palasz A.T., Mapletoft R.J., 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes : recent advances. *Biotechnol. Adv.*, 14, 127-149.

Peura T.T., Lane M.W., Lewis I.M., Trounson A.O., 2001. Development of bovine embryo-derived clones after increasing rounds of nuclear recycling. *Mol. Reprod. Dev.*, 58, 384-389.

Pollard J.W., Leibo S.P., 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41, 101-106.

Ptak G., Dattena M., Loi P., Tischner M., Cappai P., 1999. Ovum pick-up in sheep : efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*, 52, 1105-1114.

Pugh P.A., Tervit H.R., Niemann H., 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 58, 9-22.

Rall W.F., Fahy G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, 313, 573-575.

Rizos D., Ward F., Boland M.P., Lonergan P., 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, 56, 1-16.

Rizos D., Lonergan P., Ward F., Duffy P., Boland M.P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo* : implication for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 234-248.

Scheffen B., Van der Zwalm P., Massip A., 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters*, 7, 260-269.

Traldi A.S., 2000. Vitrification of goat *in vivo* and *in vitro* produced embryos. 7th International Conference on Goats, Tours, Poitiers, France, 1031.

Ulrich P., Nowshari M.A., 2002. Successful direct transfer of a deep frozen-thawed equine embryo. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 109, 61-62.

Vajta G., 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60/61, 357-364.

Vajta G., Booth P.J., Holm P., Greve T., Callesen H., 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo-Letters*, 18, 191-195.

Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H., 1997b. Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and in-starw direct rehydration. *J. Reprod. Fertil.*, 111, 65-70.

Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H., 1997c. Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Vet. Scand.*, 38, 349-352.

Vajta G., Holm P., Kuwiyama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H., 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification : a new way to

reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51, 53-58.

Vanderzwalmen P., Zech H., Prapas N., Nijjs M., Vandamme B., Segal-Bertin G., Debauche C., Lejeune B., Van Roosendaal E., 1999. Pregnancy and implantation rates after transfers of fresh and vitrified embryos on day 4 or 5. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 16, 147.

Vanderzwalmen P., Bertin G., Debauche C., Standaert V., Van Roosendaal E., Vandervorst M., Bollen N., Zech H., Mukaida T., Takahashi K., Schoysman R., 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages : effect of

artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum. Reprod.*, 17, 744-751.

Van Wagendonck de Leeuw A.M., den Daas J.H.G., Rall W.F., 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods : vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 48, 1071-1084.

Vullers T., 2003. Recovery and freezing of embryos for use in commercial equine embryo transfer programme. 3rd Meeting of the European Equine gamete group, Pardubice, Czech Republic, 20.

Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P., 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196° C and -269° C. *Science*, 178, 411-414.

Wilmot I., Rowson L.E.A., 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 1973, 92, 686-690.

Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y., Hachinote Y., 1982. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil*, suppl., 32, 399-403.

Résumé

Le début de la cryoconservation d'embryons de mammifères remonte aux années 70. Depuis, les techniques se sont multipliées et diversifiées pour essayer de répondre aux problèmes que posaient certaines espèces, certains stades de développement embryonnaire et les embryons fragilisés comme les embryons produits *in vitro*, issus de clonage ou encore les embryons biopsiés. Sont principalement utilisées, la congélation lente qui est basée sur l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de l'embryon, la vitrification qui transforme rapidement la phase liquide du cytoplasme embryonnaire en phase solide amorphe appelée « état vitreux », et l'OPS (Open Pulled Straw) qui est une vitrification très rapide. Chaque technique a ses avantages et ses inconvénients, mais la congélation lente est actuellement la technique de référence sur le terrain en ovin, caprin et bovin avec des embryons produits *in vivo*. Par contre, pour les porcins, seule la technique d'OPS permet une bonne cryoconservation des embryons. Dans l'espèce équine, aucune technique ne donne de très bons résultats : les poulains nés après transfert d'embryons cryoconservés sont encore rares.

Abstract

Cryopreservation of embryos in farm animals

Cryopreservation of mammalian embryos was developed during the late 1970s. Since then, the cryopreservation techniques have been diversified and improved to try to cryopreserve embryos from most species, at different developmental stages, and more sensitive embryos such as *in vitro* produced, cloned or biopsied embryos. Slow freezing (or equilibrium freezing) and vitrification are the main cryopreservation techniques commonly used. Slow freezing attempts to maintain a delicate balance between cryoprotectants and the aqueous embryo compartment, whereas the strategy of the vitrification method is a rapid solidification of liquid without ice crystal formation. The OPS technique (Open Pulled Straw) is a faster vitrification process. All techniques offer advantages and disadvantages, but slow freezing is currently the most used on farm applications in sheep, goats and cattle with embryos produced *in vivo*. In pigs, only the OPS technique allows to cryopreserve embryos with good success. In the equine, none of these different techniques gives good results : only a few foals have been born after transfer of cryopreserved embryos.

GUIGNOT F., 2005. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA Prod. Anim.* 18, 27-35.

