9077

Mpo 870104

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE VETERINAIRE

DES PAYS TROPICAUX

Bibliothèque de l'I.E.M.V.T.

DESS DE PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

CONGELATION DES EMBRYONS

- PRINCIPE, METHODE ET RESULTATS DE LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS DE BOVINS.

- ETUDE EXPÉRIMENTALE DE LA SURVIE DU DEMI-EMBRYON DE SOURIS CONGELÉ.

ANNÉE 1986-1987

SÉBASTIEN LE BEL

UNCEIA

13 RUE JOUËT
94703 MAISONS-ALFORT

Bibliothèque de V.I.E.M.V.I.

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE VETERINAIRE

DES PAYS TROPICAUX

DESS DE PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

CONGELATION DES EMBRYONS

- PRINCIPE, METHODE ET RESULTATS DE LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS DE BOVINS.

- ETUDE EXPÉRIMENTALE DE LA SURVIE DU DEMI-EMBRYON DE SOURIS CONGELÉ.

ANNÉE 1986-1987

SÉBASTIEN LE BEL

UNCEIA

13 RUE JOUËT
94703 MAISONS-ALFORT

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Contfle des Reproducteurs (Maisons-Alfort).

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur le Docteur M.THIBIER, Directeur du LABORATOIRE DE CONTROLE DES REPRODUCTEURS,qui a eu la gentillesse de m'accueillir dans son laboratoire.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur le DocteurM.NIBART pour m'avoir accepté dans son équipe de transfert embryonnaire.

Le travail qu'il m'a confié n'aurait pu être mené à bien sans son assistance et ses conseils.

Je remercie vivement,

Monsieur le Docteur GRUVEL, de l'IEMVT pour l'aide qu'il m'a apporté.

Monsieur le Docteur CLOUET, Secrétaire Général de l'Ordre des Vétérinaires pour le soutien qu'il m'a accordé à l'occasion de ce stage.

I° PARTIE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La Congélation de l'Embryon de Bovin

Table des matières,

Introduction 1

I CONGELATION DES EMBRYONS BOVINS ; ASPECTS THEORIQUES ET PRATIQUES : 2

A) ASPECTS THEORIQUE DE LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS : 2

1 Modifications observées au cours du refroidissement d'un milieu de conservation : 2

2 Viabilité de l'embryon et refroidissement du milieu ; 2

3 Modalités théoriques de la congélation ; 3

B) ASPECTS TECHNIQUES DE LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS : 3

1 Description de la méthode classique de congélation ; 4

a Addition du cryoprotecteur 5

b Conditionnement de l'embryon 5

c Cycle de congélation 6
α Changement de phase 7
β Vitesse de refroidissement 7
γ Palier de température 7

d Conservation des embryons dans l'azote 7

e Décongélation des embryons 8

f Elimination du cryoprotecteur 8

2 Perspectives d'évolution ; 9

a Simplification et raccourcissement du protocole de congélation 9
α Congélation en deux étapes 9
β Déhydratation partielle et congélation 9
γ Vitrification 11

b Elimination du cryoprotecteur 11
α Mode d'action du saccharose 12
β Utilisation pratique 12

II RESULTATS ET FACTEURS DE VARIATION :

A) RESULTATS :

1 Critères d'appréciation : 14

a Appréciation de la survie in vitro 14
α Techniques de mise en culture 15
β Modalités d'appréciation des embryons 15

b Appréciation de la survie in vivo 17

2 Résultats moyens de survie des embryons congelés : 17

a Résultats in vitro 17

b Résultats in vivo 18

3 Survie des embryons congelés et diversité des protocoles de congélation : 18

B) FACTEURS DE VARIATION :

1 Impact du délai séparant la collecte de la congélation : 20

2 Importance de l'embryon : 21

a Influence du stade de développement 21

b Influence de la qualité embryonnaire 21

3 Influence des traitements effectués avant congélation : 23

a Biopsie et congélation 23

b Bissection et congélation 23

c Congélation et culture 24

Conclusion 25

Bibliographie 26

Introduction :

Il faut remonter à 1951 pour assister à la réussite du premier transfert d'un embryon,Vingt ans plus tard,en 1973 naquit le premier veau issu d'un embryon congelé,Depuis,la congélation des embryons n'a cessé de se développer car elle présente un moyen fiable,pratique et peu onéreux de conserver de jeunes embryons de 6 à 8 jours,de dissocier collecte et transfert dans le temps et l'espace.

De nombreuses recherches,faites sur les risques éventuels de transmission de maladies bactériennes et virales,ont montré que ces risques peuvent être réduits,voir nuls en respectant certaines conditions de manipulation de l'embryon in vitro;en conséquence l'embryon congelé apparaît comme un moyen sur d'échanger du matériel génétique,entre régions,pays et continents à statuts sanitaires différents.

L'illustration du développement de l'utilisation d'embryons congelés s'inscrit dans le succés que connaissent les importations d'embryons provenant des Etats-Unis pour les centres d'insémination français et les exportations qui sont pratiquées en direction notamment des pays latino-américains.

Sur le plan technique,la méthode de base dérive de celle qui fut mise au point en 1972 par Whitingham pour congeler de jeunes embryons de souris.

L'évolution des techniques a permis de simplifier et de raccourcir l'étape de congélation permettant ainsi de la pratiquer dans les conditions de terrain.

Classiquement on conçoit la congélation comme la succession d'un certain nombre d'étapes clefs dont il faut maîtriser le déroulement pour obtenir un taux de survie convenable

Dans un premier temps les aspects théoriques et pratiques de la congélation seront évoqués,puis nous nous intéresserons aux résultats acquis dans ce domaine,avant d'examiner les principaux facteurs de variations susceptibles de moduler le taux de survie de l'embryon congelé.

I CONGELATION DES EMBRYONS BOVINS ; ASPECTS THEORIQUES ET PRATIQUES :

Après avoir examiné l'aspect théorique de la congélation des embryons bovins, les techniques utilisées dans ce domaine seront exposées.

A) ASPECTS THEORIQUES DE LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS :

Après avoir décrit dans un premier temps les phénomènes physiques et chimiques accompagnant le refroidissement d'un liquide, les conditions de survie cellulaire à cette épreuve seront définies avant d'énoncer les modalités théoriques de la cryoconservation de l'embryons.

1) Modifications observées au cours du refroidissement d'un milieu de conservation :

Au cours de la congélation d'un milieu salin, tel le PBS, deux phénomènes peuvent s'observer à partir d'une certaine température :

- La formation de cristaux de glace (changement de phase).
- L'élévation de la pression osmotique de la solution saline qui accompagne le changement de phase, s'accompagne de modifications chimiques du milieu (augmentation de concentration de la phase saline, modification de pH), encore appelées " effet de solution "[Lovelock 1953b].

Ces deux types de phénomènes vont conditionner la survie de l'embryon au cours de sa congélation.

2) Viabilité de l'embryon et refroidissement du milieu :

Avant que débutent les premiers essais de cryoconservation des embryons, des études de congélation ont été réalisées sur d'autres types cellulaires. La congélation de spermatozoïdes [Polge 1949], d'érythrocytes [Rapatz 1965] ou de fibroblastes [Farrant 1977 1985] a montré que la survie cellulaire reste inversement proportionnelle à la quantité d'eau intracellulaire présente au moment de la congélation.

En d'autres termes la survie de l'embryon est liée à son degré de déshydratation; déshydratation qui s'effectue à l'occasion de la congélation par élévation de la pression osmotique du milieu.

Tout l'art de congeler les embryons revient alors à mener à bien la déshydratation de ce dernier en limitant les dommages occasionnés par la croissance des cristaux de glace et les modifications osmotiques et chimiques du milieu [Lovelock 1953b,Leibo 1977].

3) Modalités théoriques de la congélation :

L'addition d'un cryoprotecteur et le contrôle du cycle de refroidissement et réchauffement sont les deux étapes clefs de la congélation des embryons.

Les cryoconservateurs sont des solvants organiques qui diffusent dans l'espace intra-cellulaire.Bien que leurs modes d'action soient mal connus,on a constaté qu'ils modifient les propriétés physiques des solutions [Renard 1982b,Heyman 1986].Ils abaissent le point de congélation du milieu [Leibo 1977],protègent les cellules des "effets de solution" [Lovelock 1953a 1953b],modifient la formation des cristaux de glace intracellulaire en diminuant la vitesse de cristallisation et en favorisant la formation de cristaux ronds [Mazur 1966,1977].Ils auraient enfin un effet protecteur sur les membranes cellulaires,

La maîtrise du cycle de congélation consiste,par un lent refroidissement,à déshydrater partiellement l'embryon tout en limitant la formation de la glace intracellulaire.A un certain niveau de déshydratation l'embryon est alors plongé dans de l'azote liquide (-196°C).Trois paramètres caractérisent cette première phase de congélation :la température d'induction de cristallisation du milieu, la vitesse de refroidissement et la température de mise en place dans l'azote liquide,déterminent l'intensité de déshydratation de l'embryon au cours de la congélation [Renard 1982b,Herrera 1985].

L'étape de décongélation s'effectue à une vitesse suffisante pour empêcher tout phénomène de recristallisation de la glace,si l'embryon n'étant pas déshydraté complètement.

B) ASPECT TECHNIQUE DE LA CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS :

les techniques actuelles de congélation des embryons de bovins dérivent de la méthode de base de Whitingham et coll, 1972 mis en pratique pour congeler des embryons de souris au stade 8 cellules.

Tableau N° I : Méthode de base utilisée pour la congélation des embryons de souris au stade 8 cellules,
D'après Whitingham et coll, 1972,

- Equilibration des embryons avec un cryoprotecteur (DMSO 10 p,100),
- Induction à -5°C du changement de phase,
- Refroidissement lent de 0,2-0,8 °C par minute jusqu'à -80°C,
- Stockage dans l'azote liquide (-196 °C),
- Décongélation lente jusqu'à 0°C,
- Retrait progressif du cryoprotecteur par étapes,

A partir de ce schéma,une méthode fut adaptée aux embryons bovins et le premier veau naquit après congélation et transfert en 1973 [Wilmut et Rouson],

Actuellement après un peu plus de 10 ans de recherche,on peut considérer qu'il existe une méthode classique de cryoconservation des embryons,utilisée sur le terrain par les équipes de transfert,A celle-ci s'ajoutent des procédés nouveaux qui tendent à simplifier et raccourcir le processus de congélation,

Chacune de ces techniques seront abordées en dégageant les éléments les plus significatifs,

1) <u>Description de la méthode classique de congélation</u> :

Le protocole habituellement mis en oeuvre pour congeler-décongeler les embryons bovins [Chupin 1985a) Nibart (1986),Rall (1986),Renard (1982b)] se conçoit comme une succession d'étapes clefs dont le respect de leur sticte application est déterminant pour la survie embryonnaire,

Classiquement on peut découper un cycle de congélation-décongélation en 6 étapes dont nous étudierons les principales caractéristiques,

(a) Addition du cryoprotecteur,

(b) Conditionnement de l'embryon,

(c) Contrôle de la phase de congélation,

(d) Conservation dans l'azote liquide,

(e) Contrôle de la phase de décongélation.

(f) Elimination du cryoprotecteur.

a) Addition du cryoprotecteur :

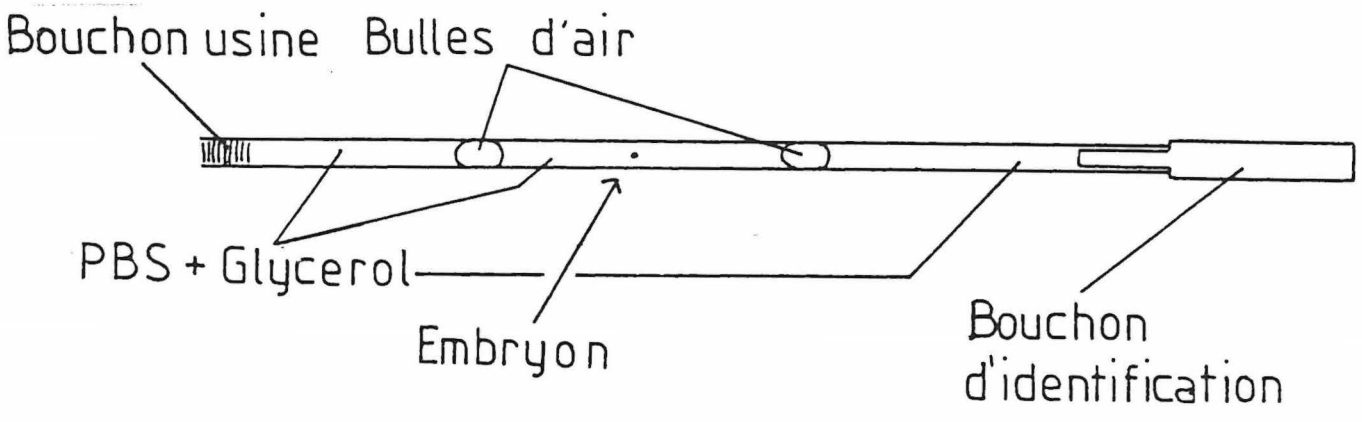
Utilisé comme cryoprotecteur dans les premiers essais de congélation,le DMSO fut rapidement remplacé par d'autres glycols.Actuellement le glycerol est le cryoprotecteur le plus employé.A la concentration de 10 p.100 (1.5 M) il est non seulement moins toxique que le DMSO mais se distingue aussi par une meilleur stabilité chimique et un meilleur effet cryoprotecteur (20 p.100 de glace en moins à concentration égale par rapport au DMSO).
[Bouyssou 1982,Renard 1982b,Franks 1984,Heyman 1986].

Abandonnant la pratique des trois bains successifs,l'addition du glycérol se fait en une étape dans un bain à 10 p.100 maintenu à température ambiante ou à 37°C pour favoriser les échanges cellulaires [Chupin 1987b)],L'embryon est placé dans cette solution de 10 à 30 minutes le temps que le cryoprotecteur diffuse dans l'espace intracellulaire [Chupin 1984b 1985b,Rall 1986].

b) Conditionnement de l'embryon :

Initialement le conditionnement des embryons se faisait dans des ampoules de verre.Cette pratique est quasiment abandonnée,la paillette apparaissant comme un moyen de transport simple et pratique.

Figure N°1 ; Schémas d'une paillette .



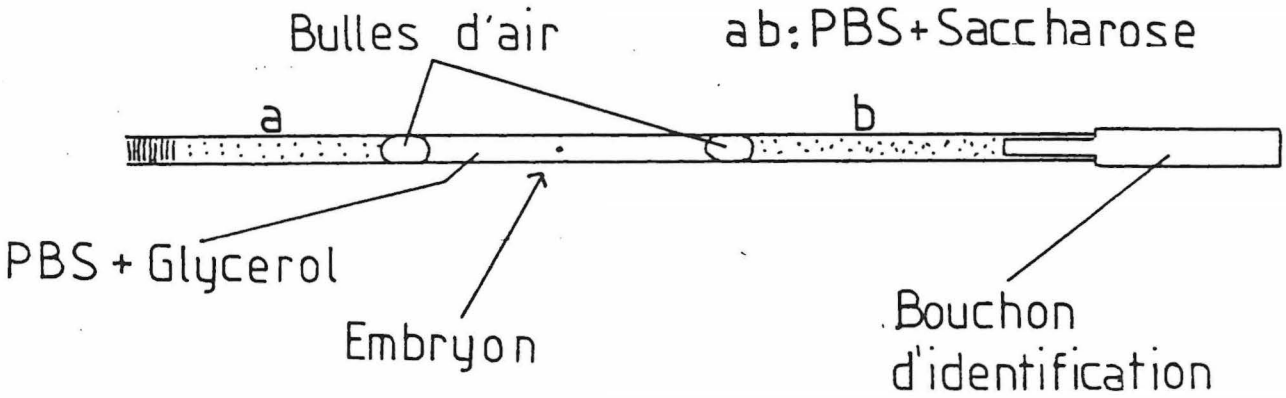
Ce mode de conditionnement n'influe en aucune manière la survie de l'embryon [Bielanski 1985 1986] et présente par ailleurs un certain nombre d'avantages:

- de part sa forme cylindrique,la paillette offre une grande surface de contact pour un volume réduit,Cette particularité permet d'envisager des échanges thermiques très rapides (>200°C /mn),ce que l'on recherche au cours de la décongélation,

- la paillettte apparait d'autre part comme un contenant facile à manipuler et stocker,Une fois l'embryon monté correctement entre deux bulles d'air,il reste facilement identifiable (bouchons de couleurs différentes-inscriptions permettant d'identifier l'embryon),La forme particulière permet de la stocker dans des bouteilles d'azote prévues pour la conservation de semence,

- enfin ce type de conditionnement tend à simplifier le travail de terrain en réduisant la manipulation des embryons,L'exemple le plus frappant est celle de la paillette au saccharose [Renard 1982a, Leibo 1985],Après décongélation le cryoprotecteur est dilué en agitant la paillette (ce qui permet de mélanger le milieu de dilution contenant du saccharose avec le milieu de congélation dans la paillette même),le transfert s'effectue alors directement sans manipulation supplémentaire de l'embryon,

Figure N°2 : Schémas d'une paillette contenant du saccharose,



c) Cycle de congélation :

L'étape de congélation consiste à refroidir progressivement l'embryon jusqu'à un certain palier de température avant d'être précipité dans un bain d'azote liquide,Le processus se distingue classiquement par trois faits majeurs [Renard 1982b,Chupin 1985b,1986b],

- le changement de phase du milieu,
- la vitesse de refroidissement du milieu,
- le palier de température précédant la mise en place des embryons dans l'azote,

α) Changement de phase du milieu :

Pour éviter la surfusion,néfaste à la survie des embryons,la cristallisation du milieu est induite à 1 ou 2 °C en dessous du point de congélation du milieu.

Dans la pratique avec une solution à 10 p.100 de glycérol,les embryons sont plongés directement dans un bain à -7°C.Après quelques minutes d'équilibration (5 à 10 minutes),la cristallisation du milieu est induite en touchant les extrémités de la paillette avec une pince préalablement refroidie dans de l'azote liquide.

β) Vitesse de refroidissement :

Pour obtenir une déshydratation graduelle de l'embryon,compatible avec sa survie,la vitesse de refroidissement doit être relativement lente.Classiquement on opte pour une vitesse de 0,3 à 0,6°C par minute.[Los Santos Valadez 1981,Renard 1981,Lehn 1983a, Bielanski 1984,Takeda 1985]

γ) Palier de température :

Les premiers essais de congélation se sont attachés à déshydrater complètement l'embryon,c'est à dire à les refroidir progressivement jusqu'à des températures de -68 -80°C [Whittingham 1972].Actuellement on opte pour une déshydratation partielle de l'embryon,celui-ci supportant sans dommage un minimum de glace intracellulaire.Le palier de température se situe aux alentours de -30 -35°C [Lehn 1981,Bielanski 1984,Takeda 1985]. Cette pratique racourcit considérablement le cycle de congélation.

d) Conservation des embryons dans l'azote :

A la fin du cycle de congélation,les paillettes sont plongées dans l'azote liquide (-196°C).Leur

conservation est alors assurée,ce qui permet de différer dans le temps et l'espace,leur utilisation.

e) Décongélation des embryons :

La décongélation s'effectue en une étape.Lorsque les embryons étaient fortement déshydratés (palier -60 -80°C),une décongélation lente à la vitesse de 12°C par minute était la condition d'une bonne survie. [Renard 1982ab,Cacheiro 1983].

Actuellement les embryons étant partiellement déshydratés ,la vitesse de décongélation doit être très rapide,supérieure à 1000°C par minute. [Renard 1981,1982ab,Chupin 1985b,1986ab,UNCEIA 1987].

Sur le plan purement technique,la paillette une fois retirée de la bouteille d'azote est,soit directement plongée dans un bain-marie maintenu à 37-38°C pendant une dizaine de secondes,soit est agitée dans l'air pendant quelques secondes (6 à 7) avant d'être plongée dans le bain-marie.D'après Tadeka 1987,cette dernière pratique donnerait de meilleurs résultats en limitant les cas de rupture de la zone pellucide.

f) Elimination du cryoprotecteur :

Après décongélation il faut éliminer le cryoprotecteur qui est toxique pour l'embryon.Le retrait de cette substance ne peut s'effectuer en une étape par dilution dans un bain dépourvu de glycérol, cette pratique exposerait l'embryon à un choc osmotique mortel (hyperhydratation de l'embryon) [Renard 1982b].Ceci explique qu'il n'est pas possible de mettre en place directement les embryons sans éliminer le cryoprotecteur comme cela est pratiqué dans le cas du sperme congelé.

La technique la plus utilisée est basée sur la dilution graduelle du glycérol.Initialement en 6 étapes [Lehn-Jensen 1981ab],on opte actuellement pour une série de quatre bains [10,0, 7,5, 5,0, 2,5 et 0 p.100 de glycérol] dans lesquels l'embryon séjourne 5 à 7 minutes avant d'être rincé au PBSA [Renard 1982b, Bielanski 1985,Rall 1986].

2) Perspective d'évolution :

Les progrès effectués dans le domaine de la congélation des embryons visent à en simplifier le processus afin d'en faciliter l'application sur le terrain.

Si un certain nombre de travaux de recherche ont été réalisés, nous nous attacherons plus particulièrement à ceux concernant la maîtrise de la phase de congélation et au problème de l'élimination du cryoprotecteur.

a) Simplification et raccourcissement du protocole de congélation :

Quatre procédés permettent de simplifier et de raccourcir le protocole de congélation.

α) Congélation en deux étapes :

Bouysson 1982.

Dans un premier temps la paillette contenant l'embryon est directement refroidie à -7°C. On induit manuellement le changement de phase en touchant une des extrémités de la paillette avec une pince préalablement refroidie dans l'azote liquide.

Dans un second temps, on congèle rapidement l'embryon [> 10°C/mn] jusqu'à la température de -25 à -30°C. L'embryon est maintenu à ce palier une trentaine de minutes avant d'être plongé dans l'azote liquide.

β) Déshydratation partielle et congélation:

* Déshydratation partielle :

La déshydratation partielle de l'embryon se fait par augmentation de la pression osmotique du milieu. On utilise habituellement une solution de saccharose à la concentration de 0,25 à 1,0 M dans laquelle l'embryon séjourne de 5 à 7 minutes.

Le premier procédé consiste à placer dans un premier temps l'embryon dans un mélange PBS-cryoprotecteur [10 p.100 glycérol ou propanediol en volume], durant 15 à 20 minutes. L'embryon est alors partiellemnt déshydraté en séjournant 5 à 7 minutes dans le mélange cryoprotecteur-saccharose.
[Bui-Xuan-Nguyen 1984, Chupin 1987a, 1987b, Rall 1986, UNCEIA 1987].

La seconde méthode revient à utiliser un seul bain de PBS contenant 1,36 M de glycérol et 0,25 M de

saccharose dans lequel l'embryon séjourne une dizaine de minutes.La pénétration du cryoprotecteur et la déshydratation partielle de l'embryon s'effectuent en une seule étape.

Le tableau ci-dessous nous donne schématiquement les différents techniques appliquées dans ces deux procédés.

Tableau n°I : Méthode de déshydratation partielle

Référence	Nombre étapes	Nature du cryoprotecteur	Saccharose en M	Durée en minutes
UNCEIA 87 Chupin 87	2	Gly. 2,1 M	0,25	7
Massip 87	1	Gly. 1,36 M	0,25	5
Chupin 87	2	Gly. 2,8 M	0,25	7
Rall 86	2	Gly. 1,5 M	1,0	5
Vincent 86	2	Pro. 1,0 M	0,1	5
Vincent 86	2	Pro. 2,0 M	0,5	5

* Congélation rapide de l'embryon :

Deux méthodes sont utilisées:

(1) Méthode de Massip (1987) :

L'embryon ayant déjà été partiellement déshydraté, la température du dernier palier ne doit pas être inférieure à -25°C.

La méthode de congélation proposée revient,aprés induction de la cristallisation à -7°C,à refroidir à la vitesse de 0,3°C/mn l'embryon jusqu'à -25°C.

En effet en portant l'embryon aux températures de -30 ou -35°C,la déshydratation cellulaire devient excessive,diminuant de quelques points le taux de survie des embryons.

(2) Méthode de Chupin (1986ab) :

La méthode proposée permet de congeler l'embryon en une étape sans induire manuellement la cristallisation du milieu.L'embryon,conditionné en paillette,est maintenu dans le col d'une bouteille d'azote à une distance (d) bien définie du niveau du liquide. L'extrémité inférieure de la paillette est refroidie à -170°C,la cristallisation s'amorce alors automatiquement et remonte vers l'embryon qui se trouve à la température de -9 -11°C.[d(embryon-azote) = 2/3 D + 2; D:distance azote-col].Après 5 minutes d'équilibration, la paillette est progressivement plongée dans l'azote liquide.

γ) Vitrification :
[Massip 1986]

La vitrification est un phénomène physique se caractérisant par le passage progressif de l'état liquide à l'état amorphe,solide,sans aucune transition brutale,sans formation de cristaux de glace dans le cas des solutions hydriques.Cette technique apparaît particulièrement intéressante dans la mesure où elle permet de congeler des embryons en éliminant un des facteurs limitants : la formation des cristaux de glace intracellulaires.

La vitrification du milieu se produisant à des concentrations élevées de cryoprotecteur,la toxicité d'un tel milieu fut réduit en en diminuant la durée d'exposition des embryons et en utilisant un mélange de deux cryoprotecteurs,le glycérol et le propanediol.

Techniquement,on procède de la manière suivante;
L'embryon séjourne dans un premier bain [PBS + 10 p.100 de glycérol + 20 p.100 de propanediol] pendant 10 minutes;il est ensuite monté en paillette dans un second milieu titrant 25 p.100 de glycérol et 25 p.100 de propanediol en volume.La congélation s'effectue en plongeant directement la paillette dans l'azote liquide.

b) Elimination du cryoprotecteur :

Les travaux dans ce domaine ont visé à simplifier et raccourcir l'étape d'élimination du cryoprotecteur. L'utilisation d'une solution hypertonique de saccharose permet d'envisager le retrait du glycérol en une étape (au lieu des quatre bains habituels),en minimisant le nombre de manipulations de l'embryon. [Rall 1986,Renard 1982b]

Après avoir brièvement expliqué le mode d'action du saccharose,nous exposerons les modalités de son utilisation pratique.

α) Mode d'action du saccharose :

Le saccharose confère à la solution dans laquelle il est incorporé (ici le PBS) un fort pouvoir osmotique,étant donné qu'il ne diffuse pas dans l'espace intra-cellulaire.Le principe d'élimination du cryoprotecteur repose sur cette faculté.En présence de ce milieu hyperosmotique,l'embryon se réhydrate progressivement au fur et à mesure de la diffusion du glycérol;le saccharose se comporte comme un osmoprotecteur limitant tout choc osmotique dû à une réhydratation brutale.

Le saccharose agirait par ailleurs au niveau du métabolisme de l'embryon en facilitant le fonctionnement des pompes ATP membrannaires.

β) Utilisation pratique :

Le saccharose s'utilise à des concentrations de l'ordre de 0,25 à 1,0 M.Le saccharose étant toxique pour les embryons,le temps de séjour ne doit pas dépasser 7 à 10 minutes pour une solution à 1,0 M [Bielanski 1985,Chupin 1987a] et un 20 minutes environ dans une solution à 0,25 M [Heyman 1986,Renard 1982a].

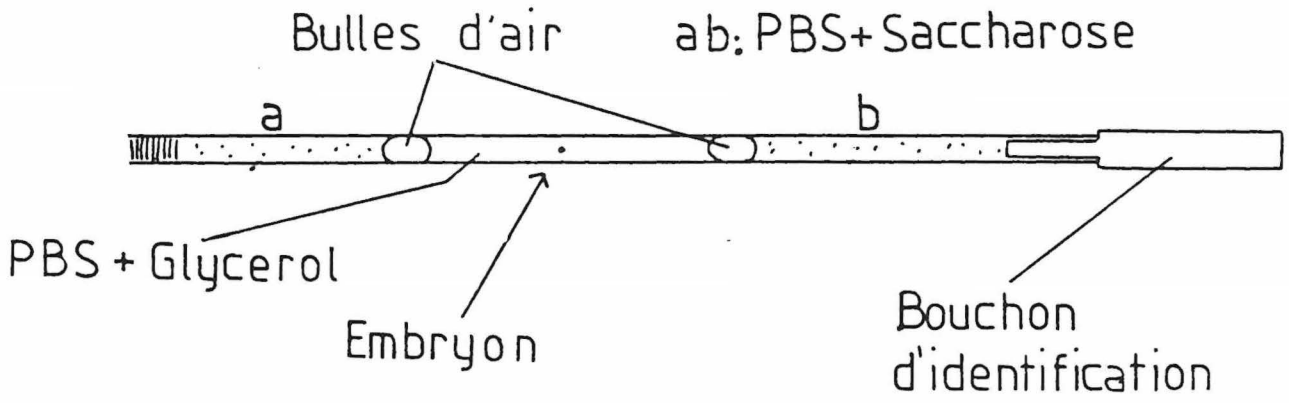
L'addition du saccharose peut s'effectuer de différentes manières [Chupin 1984a,1985b,1986b,Heyman 1984].

Après décongélation,le contenu de la paillette est expulsé dans une solution de PBS contenant du saccharose;l'élimination du cryoprotecteur s'effectuant ainsi en dehors de la paillette.

La seconde solution consiste à utiliser la paillette comme support du retrait du glycérol.

Dans un premier cas de figure [Renard 1982a],le montage de l'embryon permet d'associer dans la même paillette le milieu à 10 p.100 de glycérol (contenant l'embryon) et la solution de saccharose,les deux milieux étant séparés par une bulle d'air (Figure n°3).Après décongélation,on agite la paillette de manière à chasser la bulle d'air permettant ainsi au deux fractions de se mélanger,sans que l'on ait besoin de manipuler l'embryon.

Figure n°3 : Schémas de la paillette de Renard



L'autre type de montage vise à simplifier au maximum toute manipulation [Massip 1987]. L'embryon, préalablement déshydraté dans le mélange glycérol-saccharose, est monté en paillette en utilisant le même type de milieu. Après décongélation, la fraction saccharose permet à l'embryon de se réhydrater progressivement au fur et à mesure de la diffusion passive du glycérol.

II RESULTATS ET FACTEURS DE VARIATIONS :

Dans cette seconde partie,les résultats acquis dans ce domaine et les facteurs suceptibles d'influencer le niveau de survie des embryons seront exposés.

A) RESULTATS :

Ce chapitre aborde les résultats concernant la survie des embryons après un cycle de congélation-décongélation.

Nous nous intéresserons aux critères permettant d'apprécier la survie et le développement de l'embryon,avant d'exposer les résultats enregistrés in vivo et in vitro.Un tableau rendra compte des niveaux de survie obtenus avec les différents types de protocoles mis en oeuvre.

1) Critères d'appréciation :

L'appréciation de la survie des embryons peut s'effectuer selon deux méthodes; in vitro en contrôlant le développement en culture et in vivo en examinant le taux de gestation après transfert.

Si la première pratique permet de traiter un nombre plus important de données en limitant les couts d'investigations,la seconde reflète la réalité exacte du phénomène.

La corrélation entre ces deux méthodes d'appréciation n'est pas constante.Elle existe dans certaines circonstances [Herrera 1985],ce qui permet d'exploiter les résultats obtenus in vitro pour préjuger toutefois de la survie in vivo,l'importance de la mortalité embryonnaire dans l'espèce bovine [Renard 1982b] limite l'interprétation des résultats de culture et priviligie les expériences de transferts après décongélation.

Nous aborderons successivement chacune de ces techniques d'appréciation,en analysant les méthodologies utilisées.

a) Appréciation de la survie in vitro :

Après décongélation et élimination du cryoprotecteur,les embryons sont mis en culture pendant 24 à 48 heures,période durant laquelle leur survie est évaluée.

α) Techniques de mise en culture :

Les embryons sont mis en culture pendant 24 à 48 heures à 37-38°C dans un milieu approprié à leur développement. On utilise à cette fin trois types de milieu :

- Milieu B2 gazé à 5 p.100 de CO2.
  Bouyssou 1982
  Bui-Xuan-VGuyen 1984
  Renard 1982a

- Milieu HAM F10 gazé à 5 p.100 de CO2 et enrichi en serum de veau foetal (SVF) décomplémenté à raison de;
  5 p.100 [Takeda 1985]
  10 p.100 [Niemann 1985, Voelkel 1984]
  15 p.100 [Takeda 1987]
  20 p.100 [Bondioli 1985].

- Certains auteurs [Bielanski 1984 1986, Chupin 1984b 1986a 1987a, Farrand 1985, Lehn-Jensen 1981] utilisent comme milieu de culture du PBS enrichi en SVF décomplémenté (10 à 20 p.100), lequel est parfois gazé [Cacheiro 198].

β) Modalités d'appréciation des embryons :

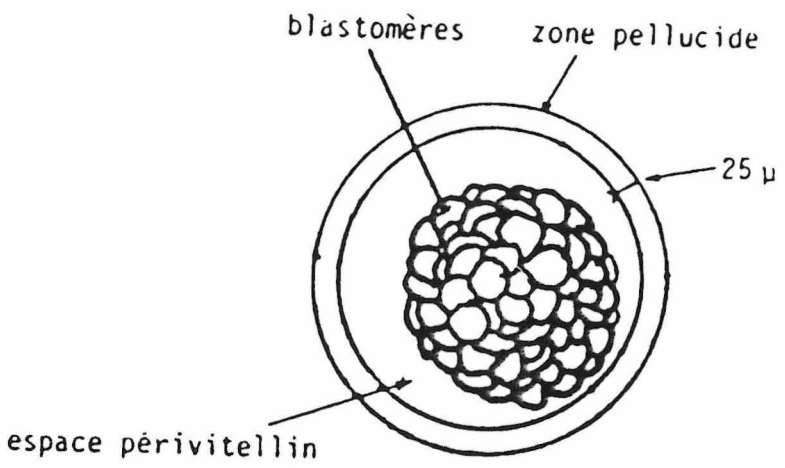
Le jugement des embryons fait appel à l'observation ainsi qu'à certains tests biochimiques.

• L'observation morphologique permet d'estimer la qualité et le degré de développement de l'embryon. Au stade morula et blastocyste (J7 - J8), on distingue quatre catégories d'embryons selon leur qualité; excellent, bon, moyen et médiocre [INRA 1980].

La figure n°4 schématise l'aspect morphologique d'un embryon au stade morula puis blastocyste.

J6

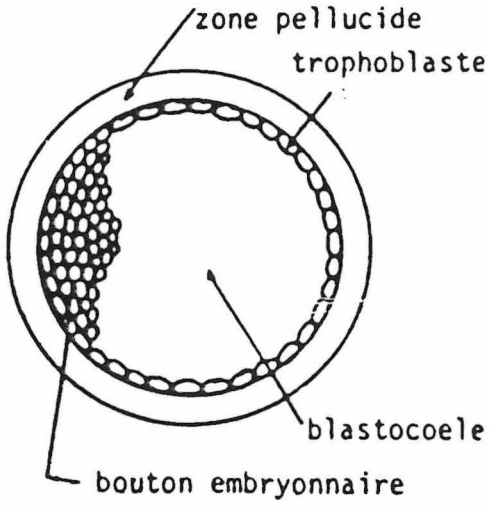
Morula



nombre de cellules : 30 à 60

J8-J9

Blastocyste



nombre de cellules : 70-180

Le tableau n°II résume les critères d'appréciation utilisés.

Tableau n°II : Appréciation de la qualité et du degré de développement des embryons d'après l'INRA 1980 .

* Jugement de la qualité d'un embryon,on recherche et observe :

  (1) L'intégrité de la zone pellucide

  (2) La forme générale de l'embryon
  - régularité
  - opacité
  - aspect des structures visibles (trophoblaste,bouton embryonnaire, blastocoele)

  (3) Aspect de la masse cellulaire
  - degré d'agrégation des cellules
  - cellules détachées
  - taille des cellules
  - signe de dégénérescence cellulaire (noyau picnotique,vacuolisation)

* Jugement du développement des embryons,on recherche :

  (1) Stade morula : apparition du blastocoele

  (2) Stade blastocyste :
  Jeune blastocyste;développement du blastocoele
  Blastocyste épanoui;sortie de la zone pellucide

Certains tests biochimiques permettent de juger moins arbitrairement la vitalité des embryons.

Le test d'absorption du glucose mesure l'intensité de l'activité métabolique des embryons à J10.Seuls les blastocystes glucose + (consommation de glucose supérieure à 2,5 µg par h de culture) sont estimés, viables,donc transférables [Renard INRA 1980].

Les procédés actuellement les plus utilisés sont des tests de coloration présentant le double avantage d'être facilement mis en oeuvre et rapidement interprétables.

• Le test au diacétate de fluoresceine (FDA) apparaît comme étant le plus utilisé [Bielanski 1986, Blakewood 1987,Franks 1985,Renard 1982b,Rodrigues 1987].Le FDA diffuse dans l'espace intra-cellulaire et devient fluorescent au contact des hydrolases présentes dans les cellules vivantes.Une incubation de 3 à 6 minutes dans le FDA est suffisante pour trier les embryons [INRA 1980].

• D'autres types de colorants sont utilisés,

Renard (1982c) propose l'utilisation conjointe de deux colorants le rouge neutre et le bleu trypant,Le principe repose sur le fait que seuls les embryons viables,plongés 5 minutes dans une solution à 0,02 p.100 sont colorés par le rouge neutre,Le bleu trypan,permet de marquer les embryons qui ont dégénérés ou qui sont morts,

D'autres auteurs (Mechekour 1986) ont testé des colorants comme l'éosine B,Si cette substance s'avère efficace pour juger des embryons de souris,son caractère toxique limite son usage dans les conditions de pratique,

b) Appréciation de la survie in vivo :

L'appréciation de la survie in vivo de l'embryon revient à constater la gestation après transfert chez une vache receveuse,

Un premier diagnostic de gestation est effectué à 21 jours par dosage de la progestérone plasmatique,Une palpation rectale vers 60-90 jours confirmera ce diagnostic,Cette méthode permet de tenir compte du phénomène de mortalité embryonnaire qui est important dans l'espèce bovine,

2) Résultats moyens de survie des embryons congelés :

Les résultats exposés correspondent à des valeurs moyennes qui ont le mérite de refléter le niveau actuel des recherches en matière de congélation des embryons,

a) Résultats in vitro :

Trois paramètres caractérisent la survie in vitro des embryons après décongélation,ce sont :

- l'aspect morphologique après décongélation
- le développement après 24 h de culture
- le développement après 48 h de culture

Le tableau n°III nous donne les valeurs moyennes observées ces dernières années .

Tableau n°III : Survie in vitro de l'embryon après décongélation.

- Aspect après décongélation :
  71 à 85 p.100 des embryons apparaissent normaux après décongélation.
  Bielanski 1986 Bouyssou 1982
  Renard 1981 1982a
- Survie après 24 h de culture :
  Le poucentage de développement est de 65 p.100.
  Bielanski 1985 Blakewood 1987
  Bouyssou 1982 Chupin 1986b 1987a
  Lehn-Jensen 1981 Massip 1986
  Renard 1986 Takeda 1985
- Survie après 48 h de culture :
  Le pourcentage de dévelopement est de 50 p.100.
  Bouyssou 1982 Bui-Xuan-NGuyen 1984
  Cacheiro 1983 Renard 1982a

b) Résultats in vivo :

Le taux de gestation permet d'apprécier la survie in vivo des embryons après décongélation.

A l'occasion du 3° colloque de l'AETE (Association Européenne de Transfert Embryonnaire les 4 et 5 septembre 1987,Nibart et Thibier (UNCEIA) ont précisé quel est le taux moyen de gestation que l'on peut espérer après transfert.[Tableau n°IV]

Tableau n°IV : Taux de gestation après transfert, influence de la congélation et du mode de transfert [Nibart et Thibier(49)].

Mode de conservation	Mode de transfert	Taux de gestation (90j)
Frais	Cervical	50-65 p.100
Congelé	Cervical	50 p.100
Congelé	Chirurgical	55 p.100

3) Survie des embryons congelés selon les différents protocoles de congélation :

Le niveau moyen de survie in vitro et in vivo ne reflète pas la diversité des procédés de congélation des embryons.Il nous a donc paru intéressant de relever,à l'aide du tableau n°V,la technicité et les résultats obtenus avec ces différents protocoles.

Tableau n° V : Protocole de congélation et survie des

PROTOCOLE DE CONGELATION	CLASSIQUE (0,3 -0,5 °C/mn)				EN DEUX TEMPS	EN UNE TEMPS	VITRIFICATION	AUTRES PROTOCOLES	
	(1)	Variante (2)	(3)	Après dès hydratation				DMSO	Propanediol
REFERENCES	Cacheiro 1983 Elsden 1982	Chupin 84a Niemann 85 Renard 82a	Chupin 1984a Lehn Jensen 1983a	Massip 87	Bouyssou 1982	Chupin 1986b	Massip 1986	Bouys-sou 82	Renard 1981
NATURE CRYOPROTECTEUR En p.100									
• Glycéol	10	10	10	10	10	10	10 et 25		
• DMSO								10	
• Propanediol							20 et 25		10
ADDITION CRYOPROTECTEUR									
• 3 bains	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
• 1 bains	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
DESHYDRATATION Saccharose 0,25 à 0,1 M 5 à 10mn	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
CONDITIONNEMENT									
• Paillette	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
• Ampoule	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CONGELATION									
• Température cristallisation	-7°C	-7°C	-7°C	-7°C	-7°C	ds col		-7°C	-7°C
• Vitesse de refroidissement	,3°C/mn	0,3°C/mn	0,3°C/mn	0,3°C/mn	10°C/mn	bouteil, d'azote	dans l'azote	0,3°C	0,3°C/mn
• Palier d' immersion ds N2 liquide	-30°C	-30°C	-30°C	-25°C	-30°C pd 30 mn	pendant 5 mn		-30°C	-30°C
DECONGELATION									
• Eau 37-38°C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ELIMINATION CRYOPROTECTEUR									
• Σ bains	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
• Saccharose	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
RESULTATS									
• Culture						JB BE			
> Décong,	79-87 %	82 %	?	?	86 %	↑ ↑	?	33 %	?
24 h	56 %	?	60-70 %	?	50 %	17-68 %	?	31 %	?
48 h	24-50 %	67 %		?	25	44 %	?	16	41 %
• Taux de Gestation	50-65 %	40-50 %	51 % Mo 46 % Bla 54 %	52 %	?	?	39% Morula 0% Blasto	?	?

B) FACTEURS DE VARIATION :

En dehors des différentes techniques de congélation, les principaux facteurs de variation proviennent d'après Nibart 1986 de :

- la technicité de l'équipe
- la donneuse et du taureau utilisé pour l'IA ou la saillie,
- la qualité des embryons
- l'interval de temps entre la collecte et la congélation

S'il est difficile d'apprécier l'impact des deux premiers facteurs, certains travaux ont clairement mis en évidence l'importance de la qualité de l'embryon et du délai entre collecte et congélation sur la survie de l'embryon après congélation.

Nous nous attacherons à étudier l'influence de ces deux paramètres en étudiant successivement :

- l'impact du délai séparant la collecte de la phase de congélation,
- l'importance du choix de l'embryon,
- l'influence des traitements subies par l'embryon avant congélation.

1) Impact du délai séparant la collecte de la congéletion :

D'après les travaux de Pettit 1985, la durée du délai séparant la collecte des embryons de leur congélation est déterminant quant à leur survie.

Si le délai dépasse trois heures, la survie des embryons après congélation diminue significativement.

Le tableau n°VI illustre ce propos en rapportant le taux de gestation à 90 jours en fonction du délai collecte-congélation.

Tableau n°VI : Taux de gestation après transfert d'embryons bovins décongelés,en fonction du délai collecte-congélation,D'après W.H. Pettit 1985.

Intervalle de temps entre Collecte et congélation	Taux de gestation En p.100
Inférieur à 3 heures	66 p.100 (N:119)
De 3 à 4 heures	56 p.100 (N:166)
De 4 à 5 heures	50 p.100 (N:114)
De 5 à 9 heures	45 p.100 (N:130)

2) Importance de l'embryon :

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'influence du stade de développement et de la qualité de l'embryon.

a) Influence du stade de développement de l'embryon :

Habituellement la congélation concerne des embryons au stade morula ou blastocyste.Il est possible néanmoins de congeler des embryons plus jeunes,de une à deux cellules,mais le niveau de survie in vitro reste faible (de l'ordre de 33 p.100 après 24 heures de culture).[Vincent 1985,1986]

A un niveau de développement plus avancé (morula, blastocyste) le taux de survie de l'embryon dépend du couple degré de développement-mode de congélation.

Ainsi on observe un taux de survie comparable pour un blastocyste et une morula,si cette dernière est congelée (à la vitesse de 0,3°C/mn) à un palier de température plus bas.L'explication de ce phénomène vient du fait que les cellules de la morula étant plus grosses,les échanges hydriques avec le milieu extérieur sont plus lents.Le même degré de déhydratation est ainsi obtenu en prolongeant la courbe de refroidissement de quelques degrés.

b) Influence de la qualité embryonnaire :

Nous examinerons successivement l'influence de la qualité de l'embryon au moment de sa congélation,puis

nous aborderons le rôle controversé de la zone pellucide.

* Dans le domaine de la congélation,on retiendra l'importance primordiale de la qualité de l'embryon en tant que paramètre déterminant la survie de celui-ci. [Leibo 1987,Massip 1982,Niemann 1986]

Le tableau suivant illustre la relation existant entre la qualité de l'embryon et sa survie après congélation.

Tableau n°VII : Influence de la qualité de l'embryon bovin et survie après décongélation et culture in vitro.
D'après Kennedy 1983.

QUALITE DE L'EMBRYON	SURVIE APRES DECONGELATION En p.100	POURCENTAGE DE DEVELOPPEMENT NORMAL En p.100
Excellent (1)	100 (N:11)	91 (N:11)
Bon (2)	86 (N:28)	50 (N:28)
Moyen (3)	83 (N:24)	29 (N:24)

Sur le terrain l'application de ce principe revient à congeler uniquement les embryons de bonne qualité,sélectionnés d'après leurs aspects morphologiques.Le tableau n°VIII illustre ce principe.

Tableau n°VIII Influence de la qualité de l'embryon bovin et taux de gestation après décongélation et transfert cervical.[Leibo 1986]

QUALITE DE L'EMBRYON	TAUX DE GESTATION APRES DECONGELATION ET TRANSFERT CERVICAL En p.100
Excellent	49 % (84/173)
Bon	45 % (98/220)
Mauvais	24 % (20/83)

* La zone pellucide qui enveloppe la masse cellulaire de l'embryon,a une importance plus ou moins controversée.

Selon Farrand 1985,la zone pellucide n'a pas d'influence sur la survie de l'embryon après le stade morula compactée,niveau de développemnt à partir duquel la cohésion des blastomères devient importante. Cependant les résultats de survie,après congélation d'embryons sans pellucide,restent contradictoires. Certains [Blakewood 1987,Niemann 1986,Rorie 1987, Scripongpun 1986ab,UNCEIA 1987] estiment que la zone pellucide n'a aucune impact sur la survie de l'embryon congelé. D'autres [Kanagawa 1979,Lehn-Jensen 1981] pensent que la ZP a un rôle cryoprotecteur qui augmenterait de quelques points le taux de survie après congélation de l'embryon entier.

3) Influence des traitements effectués avant congélation :

Dans ce paragraphe,nous soulèverons les problèmes liés à la bissection de l'embryon et à l'intérêt d'une période de culture avant le cycle de congélation;

a) Biopsie et congélation :

La biopsie du trophoblaste,pratiquée dans le but de sexer les embryons,est une manipulation compatible avec la congélation de ce dernier.

D'après Heyman (26) les pertes cellulaires consécutives à cette intervention ne sont que de 10 p.100 ce qui permet d'envisager de congeler avec succès les embryons biopsés.

D'après Nibart et Mechekour 1987b les taux de gestation après biopsie et transfert sont voisin de 30 p.100.

b) Bissection et congélation :

La bissection,elle,se traduit par une destruction cellulaire plus importante [15 à 18 p.100 des cellules d'après Chesné 1987;en congélant des demi-embryon on ne fait fait qu'aggraver les pertes cellulaires qui dépasse 25 p.100 de la masse cellulaire initiale,Une telle destruction permet d'assurer qu'un taux de gestation proche de 25 p.100.

Le tableau n° IX nous donne les taux de gestation obtenus en fonction du nombre d'embryon congelé.Si le taux de gestation est de 56 p.100 pour le blastocyste

entier,il tombe à 36 p.100 pour le demi-embryon [Scriponghun 1986ab],Aucune gestation n'a été obtenue à partir de quart d'embryon congelé.

Tableau n°VIII : Bissection et congélation
Influence de la qualité de l'embryon.
D'après Scriponghun 1986ab et Heymann 1984.

NBR D'EMBRYONS MIS EN PLACE	TAUX DE GESTATION En p.100
2 Blastocystes entiers	68 p.100
1 Blastocyste entier	47 à 56 p.100
2 Demi-Blastocystes	61 p.100
1 Demi-Blastocyste	25 à 36 p.100
1 Quart de Blastocyste	0 p.100

c) <u>Congélation et culture</u> :

Pour améliorer la survie du demi-embryon congelé, deux voies ont été explorées.

La première voie consiste après bissection d'un blastocyste de qualité 1 (excellent) ou 2 (bon) à mettre en culture les demi-embryons pendant 4 à 6 heures avant de les congeler.On obtient un taux de survie in vitro de 45 p.100 (85 p.100 pour les embryons entiers)[Chesné 1987,Heyman 1986,UNCEIA 1987]

Une durée de culture supérieure à 4 heures,de l'ordre de 24 heures,a un effet dépresseur sur la survie du demi-embryon.[Farrand 1985,Petit 1985]

Le second procédé revient à pratiquer la bissection après la décongélation de l'embryon entier. [Lehn-Jensen 1983b,Rorie 1987,Takeda 1987,UNCEIA 1987].

Il semble qu'actuellement la première méthode soit plus avantageuse,car elle permet d'obtenir un taux de gestation de (54 p.100),alors qu'avec le second procédé seulement 38 p.100 des demi-embryons se développent [Scripongpun 1986b,Pettit 1985],Les résultats restent néanmoins contradictoires.

Concusion :

La congélation des embryons bovins a favorisé le développement de la transplantation embryonnaire,en permettant de différer dans le temps et dans l'espace l'acte de transplantation de la collecte.

Actuellement sur les 10 000 transferts effectué en 1986,plus du tiers concernent des embryons congelés.

Techniquement le taux de gestation après transfert chirurgical d'embryons congelés reste légérement inférieur (53 p.100) à celui qui est obtenu avec des embryons frais par voie cervicale (50 et 65 p.100).

Les progrès effectués dans le domaine de la cryoconservation des embryons tendent vers une réduction et une simplification des processus.On envisage d'appliquer sur le terrain des techniques permettant de raccoucir la durée de la phase de congélation (Congélation en une à deux étape) et de simplifier le procédé de décongélation en utilisant des paillettes contenant du saccharose.

BIBLIOGRAPHIE

BIELANSKI A.,JOHNSON W.,SCHNEIDER et coll. (1984) : Plunge temperatures and embryos survival. Theriogenology 21 (1) 221.

BIELANSKI A,SCHNEIDER U.,PAWLYSHYN V.P et coll.(1985): Effect of sample container and cryoprotectant removal method on survival of deep frozen bovine embryos. Theriogenology 23 (1) 179.

BIELANSKI A,SCHNEIDER U.,PAWLYSHYN V.P et coll.(1986): Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos in vitro : The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. Theriogenology 25 (3) 429-437.

BIONDIOLI K.R.,BRUNSON C.B.,LOONEY C.R. et cool.(1984) : In vitro survival of bovine embryos frozen in media supplemented with newborn calf serum or bovine serum albumin. Theriogenology 21 (1) 223.

BIONDOLI K.R.,MERTES P.C. (1985) : The effect of Ca levels in the freezing media on in vitro survival of bovine embryos.Theriogenology 23 (1) 181.

BLAKEWOOD E.G,RORIES R.W.,POOL S.H. et coll (1987) : Frezzing bovine embryos without a zona pellucide. Theriogenology 25 (1) 141.

BOUYSSOU B.,CHUPIN D. (1982) : Two-step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxyde (DMSO) or glycerol.Theriogenology 17 (2) 159.

BUI-XUAN-NGUYEN N.,HEYMAN Y.,RENARD J.P. (1984) : Direct freezing of cattle embryos after partial dehydratation at room température. Theriogenology 22 (4) ,389-399.

CACHEIRO L.,GERLACH R.,CACHEIRO N. et coll. (1983) : Bovine embryo survival after freezing and thawing. Theriogenology 19 (1) 116.

CHRISTMAS M.J. (1983) : A novel technique for automatic seeding in embryo cryopreservation. Theriogenology 19 (1) 118.

CHESNE P.,HEYMAN Y.,CHUPIN.,PROCUREUR R. (1987) : Influence of a period of culture between splitting and freezing on survival.Theriogenology 27 (1) 218.

CHUPIN D.,FLORIN B.,PROCUREUR R. (1984 a) : Comparison of two methods for one-step in-straw thawing and direct transfert of cattle blastocysts,Theriogenology 21 (21) 455-459.

CHUPIN D.,PROCUREUR R. (1984 b) : Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts : effect of number of steps and of total duration, Theriogenology 21 (21) 230.

CHUPIN D. (1985 a) : Applications pratiques du transfert d'embryons chez les bovins. Elevage et Insémination 206 3-15.

CHUPIN D. (1985 b) : Evolution de la transplantation d'embryons BTIA 36 15-25.

CHUPIN D. (1986 a) : Quick freezing of rat and cow embryos after dehydration at room temperature,Compte rendu du 2° Colloque scientifique de l'AETE Ed Merieux Lyon 165-175.

CHUPIN D. (1986 b) : Dix ans de recherche en transfert d'embryons,BTIA 42 19-26.

CHUPIN D. (1987 a) : Quick frezing of bovine blastocyst,Theriogenology 25 (1) 147.

CHUPIN D. (1987 b) : Quick freezing of day 7 bovine blastocysts : optimum parameters of dehydration step, Theriogenology 27 (1) 219.

ELSDEN R.P.,SEIDEL G.E.,TAKEDA T., et coll. (1982) : Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred non surgically,Theriogenology 17 (1) 1-10.

FARRAND G.D et coll. (1977) : Use of two step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing,Cryobiology 14 273-286.

FARRAND G.D.,ELSDEN R.P.,SEIDEL G.E. (1985) : Effect of slow cooling end point temperature on survival of frozen bovine embryos,Journal of Animal Science 61 460-465.

FRANCK M. (1981) : La transplantation embryonnaire dans l'espèce bovine,Bulletin des GTV 1 B (212) 59-68.

FRANKS G.C.,COLEY S.L.,BETTERBED B. et Coll. (1985) : The effect of cryoprotective agents,dilution rates,freezing rates,and freezing units on the survival of bovine embryos,Theriogenology 23 (1) 194.

HEYMAN Y.,CHESNE P. (1984) : Freezing bovine embryos:survival after cervical transfert of one half, one or two blastocysts frozen in straws,Theriogenology 21 (1) 240.

HEYMAN Y. (1986) : Advances in the techniques of freezing of domestic mammal embryos.In "Séminaire sur la congélation des embryons et des ovocytes",Annecy, Juin 1986,Collection Fondation Marcel Mérieux,151-163.

HERRERA ALVAREZ H. (1985) : Contribution à l'étude de la production et de la congélation d'embryons chez les bovins,Mémoire de maîtrise es-science vétérinaire,ENVA Alfort.

INRA (1980) : Blastographie du développement précoce de l'embryon bovin superovulé. El. et Ins. 178 28 pages.

KANAGAWA H.,FRIM J.,KRUUV J.(1979) : The effect of puncturing the zona pellucida on freeze-thaw survival of bovine embryos,Can.J.Anim. Sci. 59 623-626.

KENNEDY L.G.,BOLAND M.P.,GORDON I. (1983) : Effect of bovine embryo quality on survival after rapid freezing and thawing Theriogenology 83 (19) 135.

LEHN-JENSEN H.,GREVE T.(1981a) : Survival of cow blastocysts utilizing short freezing curves,Nord.Vet. Med. 33 523-529.

LEHN-JENSEN H.,GREVE T.,PEREZ NAVAS A. (1981b) : Two step freezing of cow embryos. Theriogenology 15 (4) 427-32.

LEHN-JENSEN G. (1983 a) : Survival of cow blastocysts using cooling rates of 1°C/mn to -25°C before plunging.Theriogenology 19 (1) 138.

LEHN-JENSEN G.,WILLADSEN S.M. (1983 b) : Deep-freezing of cow "half" and "quarter" embryos. Theriogenology 19 (1) 49-54.

LEIBO S.P. (1977) : Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos.In "The freezing of mammalian embryos"(Ciba Fdn Symp n°52) 69-92,Ed. K.Elliott et J.Whelan,Elsevier Amsterdam.

LEIBO S.P. (1983) : Field trial of one-step frozen bovine embryos transferred non-surrgically. Theriogenology 19 (2).

LEIBO S.P. (1985) : Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos:an update,Theriogenology 23 (1) 201.

LEIBO S.P. (1986) : Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawwed bovine embryos,Theriogenology 25 (1) 166.

LINDNER G.M.,ELLIS D.E. (1985) : Refrigeration of bovine embryos. Theriogenology 23 202.

LOVELOCK J.E. (1953 a) : The haemolisis of human red blood cells by freezing and thawing,Bioch,Biophys, Acta. 10 414-426.

LOVELOCK J.E. (1953 b) : The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing,Bioch,Biophys,Acta 11 28-36.

LOS SANTOS-VALADEZ S.,TERVIT U.R. (1981) : Transport of frozen cattle embryos,Theriogenology 15 123.

MASSIP A.,VAN DER ZWALMEN P.,HANZEN C. et coll. (1982) : Fast freezing of cow embryos in french straws with an automatic programm,Theriogenology 18 325.

MASSIP A.,VAN DER ZWALMEN P.,SCHEFFEN B. et coll. (1986) : La vitrification,méthode d'avenir pour la cryoprotection des embryons,In "Compte rendu du 2° colloque scientifique de l'AETE",LYON Juin 1986,ED Fondation Marcel Mérieux.

MASSIP A. (1987) : Recent progress in cryopreservation of cattle embryos.
Thériogenology 27 (1) 69-79.

MAZUR P. (1966) : Theoretical and experimental effects of cooling and worming velocity on the survival of frozen and thawed cells,Cryobiologie 4 181-192.

MAZUR P. (1977) : The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates,Cryobiology 14 251-272.

MECHEKOUR F.et coll. (1986) : Note sur le test de coloration à l'éosine B pour l'évaluation de la viabiblité embryonnaire,El,et Ins. 212 15-19.

NIBART M.,BOUYSSOU B. (1981) : Le transfert embryonnaire chez lzs bovins,Rec,Med,Vet. 157 71-87.

NIBART M. (1986) : Congélation des embryons bovins : Intérêts et résultats pratiques,In "Compte rendu du 2° colloque scientifique de l'AETE",LYON Juin1986,ED Fondation Marcel Mérieux.

NIBART M. (1987) : Le transfert embryonnaire en France,In "Compte rendu du 3° colloque scientifique de l'AETE",LYON septembre 1987,ED Fondation Marcel Mérieux.

NIBART M. et MECHEKOUR F. (1987b) : "Communications personnelles".

NIEMANN H. (1985) : Freezing of bovine embryos: effects of a one-step addition of 1.4 M glycerol. Theriogenology 23 (2) 369-379.

NIEMANN H. (1986) : Recents results of freezing experiments with embryos from farm animals.In "Compte rendu du 2° colloque scientifique de l'AETE",LYON Juin 1986.ED Fondation Marcel Mérieux.

NIEMANN H.,BREM G.,SACHER B. et coll. : An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine mebryos.Theriogenology 25 (4) 519-524.

PETTIT W.H. (1985) : Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules.Theriogenology 23 13-16.

POLGE C.,SMITH A.V.,PARKES A.S. (1949) : Revival of spermatozoa after vitrification and deshydratation at low temperature.Nature 164 666.

RALL W.F. (1986) : Embryo cryopreservation:current application prospects for the future.Prog.Annual Conf. on AI and Embryo transfer in beef cattle (NAAB) IETS, Jan 11 48

RAPATZ G.,LUYET B. (1965) : Effets of cooling rates on the preservation of Erythrocytes in frozen blood containing various protective agents.Biodynamica. 9 333-350.

RENARD J.P.,HEYMAN Y.,OZIL J.P. (1981) : Freezing bovine blastocysts with propanediol as cryoprotectant. Theriogenology 81 (1)

RENARD J.P.,OZIL J.P.,HEYMAN Y. (1981) : Cervical transfert of deep frozen cattle embryos.Theriogenology 15 (3) 311.

RENARD J.P.,HEYMAN Y.,OZIL J.P. (1982a) : Congélation de l'embryon bovin : une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés une seules fois en paillettes.Ann.Med.Vet 126 23-32.

RENARD J.P. (1982b) : La conservation des embryons chez les mammifères .In "Deuxième congrès international de Transfert d'Embryons chez les Mammifères",Annecy Septembre 1982 Ed Collection Fondation Marcel Mérieux.

RENARD J.P. et coll. (1982c) : Alternative tests to assess viability of bovine embryos.Theriogenology 17 106.

RENARD J.P.,HEYMAN Y. et coll. (1983) : Sucrose dilution;a technique for field transfert of bovine embryos frozen in the straw.Theriogenology 19 (1) 145.

RENARD J.P.(1984) : Methods of conserving gametes and embryos of farm mammals.Livestock Prod.Sci. 11 49-59.

RODRIGUES J.L.,GREGORY R.M. (1987) : Alternative mechanical system to freezing embryos. Theriogenology 25 (1) 191.

RORIE R.W.,PENDLETON R.J. et coll. (1987) : Viability of demi-embryos produced before VS.After deep freezing.Theriogenology 25 (1) 192.

SCHNEIDER U.,MAZUR P. (1984) : Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos.Theriogenology 21 (1) 68-80.

SCRIPONGPUN S.,NIBART M.,MECHEKOUR F.,THIBIER M. (1986a) : Bissection d'embryons bovins.
I Survie in vitro et absence d'influence de la membrane pellucide. El. et Ins. 216 15-26.

SCRIPONGPUN S.,NIBART M.,MECHEKOUR F.,THIBIER M. (1986b) : Bissection d'embryons bovins.
II Méthode simplifiée taux de réussite in vivo et intérêt technico-économique.El.et Ins. 217 9-20.

SMORAG Z.,KATSKA L. et coll. (1986) : Freezability of oocytes and embryos of laboratory and domestic animals.In "Compte rendu du 2° colloque scientifique de l'AETE",LYON Juin 1986.ED Fondation Marcel Mérieux.

STAPLES T.R.,PAGE R.D. (1987) : A simplified method for freezing bovine embryos with a portable LN freezer requiring no external seeding.Theriogenology 25 (1) 202.

TAKEDA T.,ELSDEN R.P.,SEIDEL G.E. (1985) : Survival of cryopreserved bovine embryos colled at 0,5°C or 1°C/mn.Theriogenology 23 (1) 232.

TAKEDA T. (1987) : Effect of thawing procedures on damage to zonae pellucidae of bovine ova frozen in plastic straws.Theriogenology 27 (1) 284.

TAKEDA T.,HENDERSON W.B.,HASLER J.F. (1987) : Deep freezing of split and intact bovine embryos. Theriogenology 27 (1) 285.

UNCEIA (1987) : Compte rendu de la 13° conférence annuelle de la société internationale de transfert embryonnaire.El. et Ins. 218 21-24.

VINCENT C.,HEYMAN Y. et coll. (1985) : In vitro survival of early-stage rabbit and cow embryos directly frozen to intermediate temperature (-25 to -30°C) before plunging in liquide nitrogen. Theriogenology 23 (1) 234.

VINCENT C.,HEYMAN Y. (1986) : Freezing of early stage rabbit and cattle embryos;in vitro and in vivo survival.In "Compte rendu du 2° colloque scientifique de l'AETE",LYON Juin 1986.ED Fondation Marcel Mérieux.

VOELKEL S.A.,VIKER S.D.,LAMBETH V.A. (1984) : A new approach to freezing bovine embryos without the use of liquid cooling agents.Thériogenology . 21 (1) 272.

WHITTINGHAM D.G.,LEIBO S.P.,MAZUR P. (1972) : Survival of mouse embryos frozen to 196°C .Science N.Y. 178 411-414.

WILMUT I.,ROWSON L.E.A. (1973) : Experiments on the low temperature preservation of cow embryos.Vet.Rec. 92 686-690.

II° PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Survie du Demi-Embryon de Souris Congelé

"Influence d'une période d'une culture de quatre heures entre la bissection et la congélation".

Table des matières

Introduction 1

I MATERIEL ET METHODE : 2

1) Production d'embryons :

a) Superovulation et fécondation des ovocytes 2

b) Collecte des embryons 2

c) Jugement des embryons 2

2) Technique de bissection : 3

a) Matériel utilisé 3

b) Méthode de bissection 3

3) Congélation des embryons et des demi-embryons : 5

a) Matériel utilisé 5

b) Méthode de congélation 6

4) Décongélation et élimination du cryoprotecteur : 9

a) Décongélation 9

b) Emlimination du cryoprotecteur 9

5) Etude de la survie après décongélation et du développement en culture : 9

a) Schéma expérimental de répartition des embryons 9

b) Méthode de culture 10

c) Jugement de viabilité des embryons 10

α Jugement des embryons après décongélation 10

β Jugement après culture 11

6) Analyse statistique : 12

II RESULTATS : 13

1) Présentation générale des résultats : 13

2) Développement du demi-embryon de souris après 4 heures de culture : 13

3) Aspect des embryons de souris après décongélation : 15

4) Survie des embryons et demi-embryons après 24 et 48 heures de culture : 16

a) Influence d'une période de 4 heures de culture avant congélation sur la survie du demi-embryon 16

b) Appréciation des paramètres déterminant la survie de l'embryon de souris 17

α Présentation des résultats de survie après 24 et 48 heures de culture 17

β Influence de la congélation, de la bissection et de la culture sur la survie de l'embryon de souris 19

III DISCUSSION :

1) Matériel et méthode : 23

a) Matériel animal 23

b) Technique de bissection 23

c) Technique de culture 23

d) Appréciation de la survie après congélation 24

2) Résultats : 24

a) Aspect des embryons après décongélation et élimination du cryoprotecteur 24

b) Niveau de développemnt après 24 et 48 heures de culture 25

Congélation 26

Bibliographie 27

Introduction :

Après collecte, l'utilisation de l'embryon bovin s'effectue selon trois voies: le transfert directe, le transfert des demi-embryons après bissection ou la congélation de l'embryon qui sera utilisé ultérieurement. Actuellement il paraît impossible de pratiquer une bissection et une congélation sur le même embryon; ces deux manipulations se traduisant par une perte de plus de 30 p.100 des cellules (Heyman 1986), le taux de gestation qui en résulterait, serait incompatible avec une pratique de terrain.

Pour pallier ce phénomène, deux solutions sont proposées. La première consiste à pratiquer la bissection après décongélation de l'embryon (Rorie 1987), le second procédé revient à mettre en culture l'embryon bisséqué quelques heures avant d'effectuer sa congélation (Chésne 1987).

Notre étude se propose d'évaluer l'effet d'une culture de 4 à 6 heures avant congélation sur la viabilité de l'embryon de souris congelé.

Nous aborderons dans un premier temps les techniques et les méthodes mises en oeuvre dans ce protocole puis nous nous intéresserons aux résultats de l'expérimentation.

I MATERIEL ET METHODE :

Nous aborderons successivement les problèmes de la production des embryons de souris,de leur bissection,de leur congélation et du jugement des résultats après décongélation.

1) Production d'embryons :

a) Superovulation et fécondation des ovocytes :

Des souris âgées de 6 à 16 semaines ont été superovulées par des injections inta-péritonéales de 10 UI de PMSG (CHRONOGEST d'INTERVET).

Quarante huit heures après,l'ovulation est provoquée par l'administration inta-péritonéale de 10 UI d'HCG (ORGANON ND).La mise au mâle (1 mâle par femelle) est faite immédiatement après cette dernière injection.

b) Collecte des embryons :

Trois jours après l'injection d'HCG,les souris femelles sont sacrifiées.Les cornes utérines sont prélevées puis perfusées avec 1 ml de tampon phosphate (PBS).

La collecte et la recherche des embryons s'effectuent à l'aide d'une loupe Nikon ASM Z 10 au faible grossissement (x20-30).Les embryons sont prélevés à l'aide d'un micro-aspirateur (BRAND 259) puis,sont rincés 6 fois dans du PBSA (2g/l d'albumine), préalablement filtrés à l'aide d'un micro-filtre (Millex-GS Non pyrogénic stérile,0.22µm,MILLIPORE SA), avant d'être jugés.

c) Jugement des embryons :

La qualité des embryons collectés est appréciée en fonction de leur aspect morphologique (INRA 1980) à l'aide d'une loupe binoculaire (Nikon ASM Z 10) au grossissement 80.

Nous nous sommes intéressés aux embryons au stade blastocyste qui ont été jugés en quatre classes :

- Classe 1 (Excellent) : Stade normal de développement
  - masse cellulaire homogène
  - couleur normale
  - pas de cellule échappée
  - membrane pellucide intacte

• Classe 2 (Bon) : Un embryon de type 1 avec quelques défauts,
  - déformations de la masse cellulaire
  - coloration hétérogène

• Classe 3 (Moyen) : Embryon en retard de développement,
  - taille des cellules hétérogènes
  - présence de cellules vacuolisées ou picnotiques
  - coloration hétérogène,noirâtre

• Classe 4 (Mauvais) : Embryon dégénéré ,
  - cellules détachées
  - cellules déformées
  - cellules dégénérées (vacuolisées et picnotiques)

Seuls les embryons,au stade jeune blastocyste et blastocyste épanoui,de qualité 1 et 2 ont été utilisés dans ce travail.

2) Technique de bissection :

a) Matériel utilisé :

• Micro-manipulateur :

Les embryons ont été bisséqués à l'aide d'un micro-manipulateur de marque ALCATEL CIT,comportant deux postes dont le système de transmission est pneumatique et homothétique.

Le poste A supporte le micro-scalpel qui a été fabriqué à partir d'un éclat de lame de rasoir.

La micro-pipette de maintien est fixée au poste B du micro-manipulateur.

• Micro-forge :

Une micro-forge (ALCATEL) a servi à confectionner les micro-pipettes de maintien dont le diamètre extérieur est de 80 à 100 µm.Les extrémités des pipettes ont été rodées avec la microforge.

• Loupe binoculaire :

Les manipulations ont été effectuées sous loupe binoculaire de marque NIKON (ASM Z10) au grossissement 80 fois.

b) Méthode de bissection :

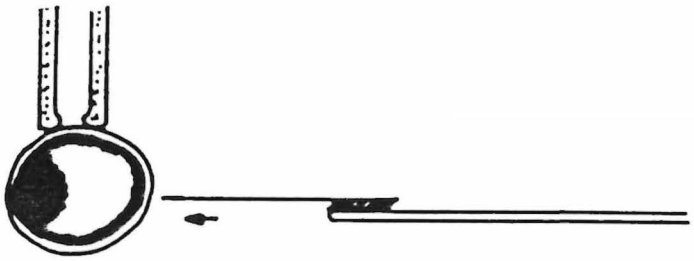
Les embryons,une fois rincés,sont déposés dans une boîte de Pétri contenant du PBS,préalablement filtrés

Figure n°1 : Technique de bissection.

1 Réglage de l'installation :

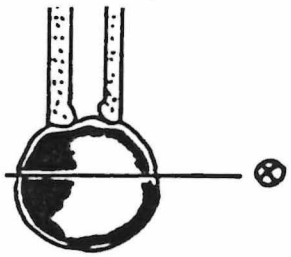
Le micro-scalpel est perpendiculaire à la pipette.

La lame est placée au dessus de l'embryon.



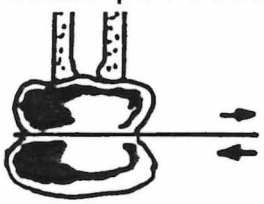
2 Ouverture de la zone pellucide :

La lame est abaissée de manière à provoquer l'ouverture de la zone pellucide.



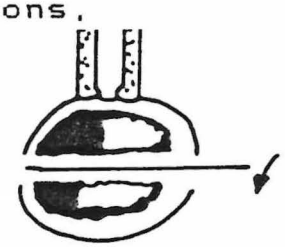
3 Section de la masse embryonnaire :

Un léger mouvement de va et vient divise la masse embryonnaire en deux parties égales.



4 Séparation des deux demi-embryons :

Un mouvement de rotation du micro-scalpel détache les deux demi-embryons.



à l'aide d'un microfiltre (Millex-GS Non pyrogénic stérile,0.22 µm,MILLIPORE SA).

La technique de bissection est la suivante :
[Figure n°1]
(1) En exerçant une légère dépression,l'embryon est maintenu à l'extrémité de la micro-pipette de telle manière que le micro-scalpel puisse couper en deux parties égales, le bouton embryonnaire,et le trophoblaste.

(2) On place le micro-scalpel au -dessus de l'embryon dans l'axe du bouton embryonnaire.

(3) Le micro-scalpel est abaissé d'un seul jet;la membrane pellucide ploit un instant puis céde brusquement,la masse cellulaire est instantanément coupée en deux parties égales.

(4) On diminue la dépression de la pipette de maintien,la bissection est alors achevée en bougeant légèrement le micro-scalpel.

(5) On déplace latéralement le micro-scalpel ce qui a pour effet de séparer les deux demi embryons.

Les demi-embryons sont soit mis en culture soit directement congelés sans être remis dans leur membrane pellucide.

3) Congélation des embryons et des demi-embryons :

a) Matériel utilisé :

Le matériel utilisé pour la congélation des embryons ,est le suivant :

• Paillettes de 0,25 ml (IMV France) et bouchons d'identification en plastique.

• Une bouteille d'azote (Air Liquide S.A France) contenant 5 à 6 cm d'azote liquide.

• Le congélateur d'Elsden se compose :
- d'un thermomètre digital (n°8500-40 COLE PARMER USA)
- d' un thermo-couple (type T COLE PARMER USA)
- d'un cylindre métallique percé d'orifices destinés à recevoir les paillettes.
- d'une tige métallique en T percée de trous à intervalles réguliers.
- d'une tige métallique droite.

b) Méthode de congélation :

• Préparation du congélateur :

La cuve d'azote est remplie de 5à 6 cm d'azote liquide.

Une paillette de 0,25 ml est remplie de PBS contenant 10 p,100 de glycérol.On introduit alors l'extrémité du thermo-couple dans la paillette témoin, de manière à le placer au niveau où se situerait l'embryon (moitié de la paillette).La paillette témoin est alors introduite dans un des trous du cylindre.On fixe le thermo-couple à la barre en T laquelle est visée dans le cylindre suivant son grand axe [Figure n°3].

• Congélation :

Le cylindre est placé dans le col de la bouteille de telle manière que la température du cylindre se stabilise autour de - 7°C (de -6 à -9°C).

Les embryons ou les demi-embryons destinés à être congelés,sont placés dans une petite boîte de Pétri contenant du PBSA (2g/l) additionné de 10 p,100 de glycérol.Ils y séjournent une dizaine de minutes avant d'être montés dans des paillettes de 0,25 ml,à raison de 4 à 5 embryons ou demi-embryons par paillette.Le montage s'effectue en aspirant des fractions de milieu de congélation et d'air, dans l'ordre suivant;

Glycérol	Glycérol	Glycérol
PBS - air -	PBS + embryon - air -	PBS

Chaque paillette est fermée par un bouchon en plastique sur lequel on porte les indications nécessaires pour identifier l'embryon ou le demi embryon.

Les paillettes sont placées directement dans les orifices du cylindre,maintenues aux alentours de -7°C.L'équilibre thermique de la paillette s'effectue en 1 à 2 minutes.Après 10 minutes à cette température,on induit la cristallisation du milieu contenant l'embryon en touchant une des extrémités de la paillette avec une pince préalablement refroidie dans de l'azote liquide.

Après quelques minutes (3 à 4);le cylindre est descendu légèrement dans le col de la bouteille de manière à amorcer un refroidissement à la vitesse de 0,3 à 0,5°C/mn.Cinquante à soixante-dix minutes plus tard on marque un palier de quelques minutes (4-5) à -30°C avant de plonger les paillettes dans l'azote liquide.[Figure n°3]

4) Décongélation et élimination du cryoprotecteur:

a) Décongélation :

Selon le protocole de Takeda (1987a),les paillettes sont maintenues quelques instants (5 à 6 secondes) dans l'air avant d'être plongées dans une cuve d'eau maintenue à 37°C et agitée doucement pendant une dizaine de secondes.

b) Elimination du cryoprotecteur :

L'élimination du glycérol est réalisée par dilution progressive du cryoprotecteur.L'embryon est placé dans 4 bains à concentration décroissante en glycérol (10%, 7,5%, 5%, 2,5%, 0%,) à raison de 5 à 7 minutes par bain.

Si la manipulation des embryons entiers s'effectue à l'aide d'un micro-aspirateur (BRAND) et de micro-pipettes de 10 µl (Drummond MICRODISPENSER),celle des demi-embryons a nécessité la confection de micro-pipettes plus adaptées à leurs tailles (30 à 40 µm environ).

5) Etude de la survie après décongélation et du développement en culture :

Le jugement est réalisé par l'étude de la survie in vitro du demi-embryon aprés décongélation.

a) schéma expérimental de répartition des embryons :

Afin d'interpréter statistiquement les résultats de survie,il apparut nécessaire de constituer plusieurs lots témoins permettant de relativiser le degré de survie des demi-embryons congelés après quelques heures de culture.

La répartition des embryons est la suivante :

Figure n°2 : Présentation du dispositif d'Elsden utilisé pour congeler les embryons.

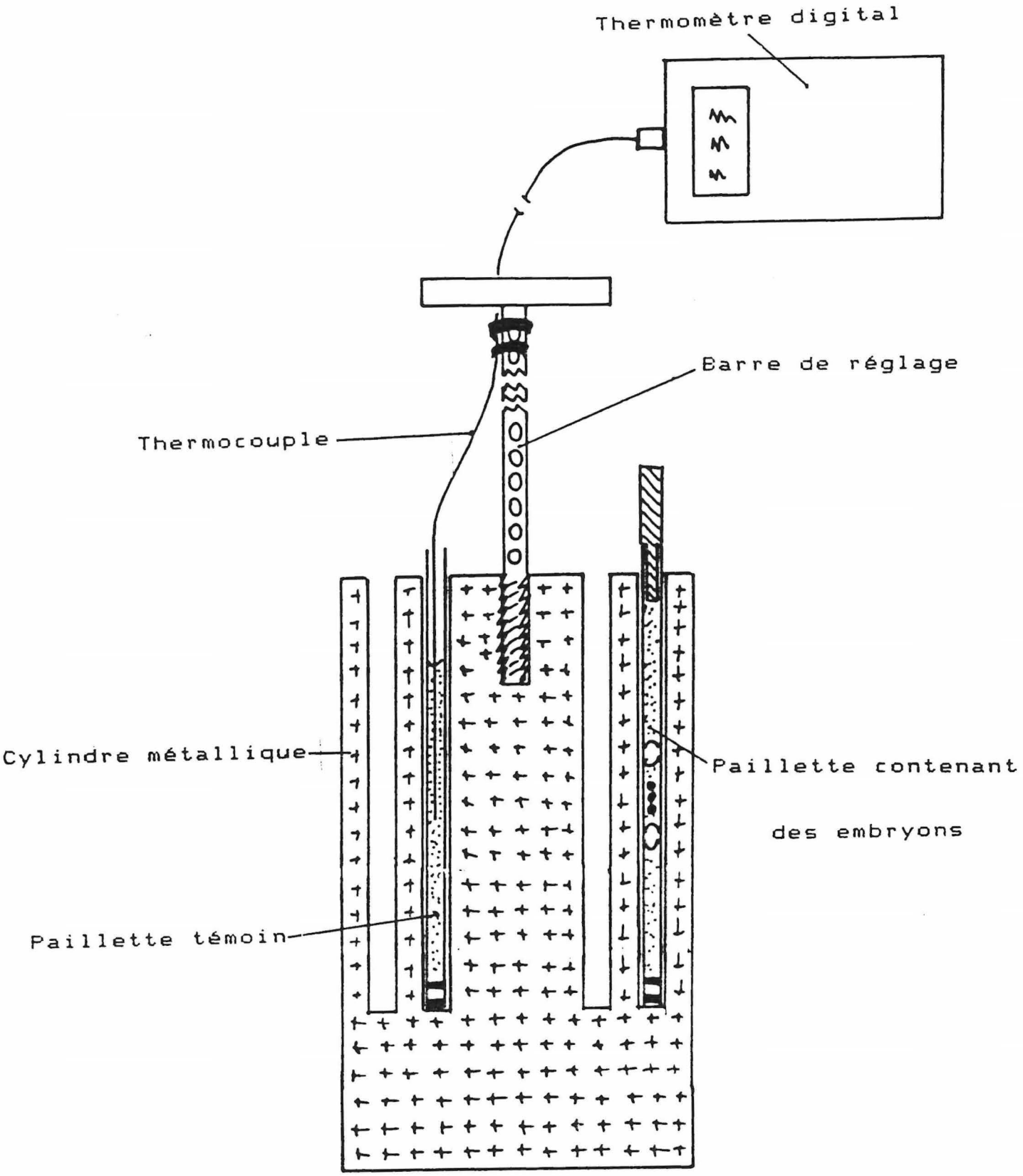


Figure n°3 : Disposition du cylindre de congélation dans la bouteille d'azote.

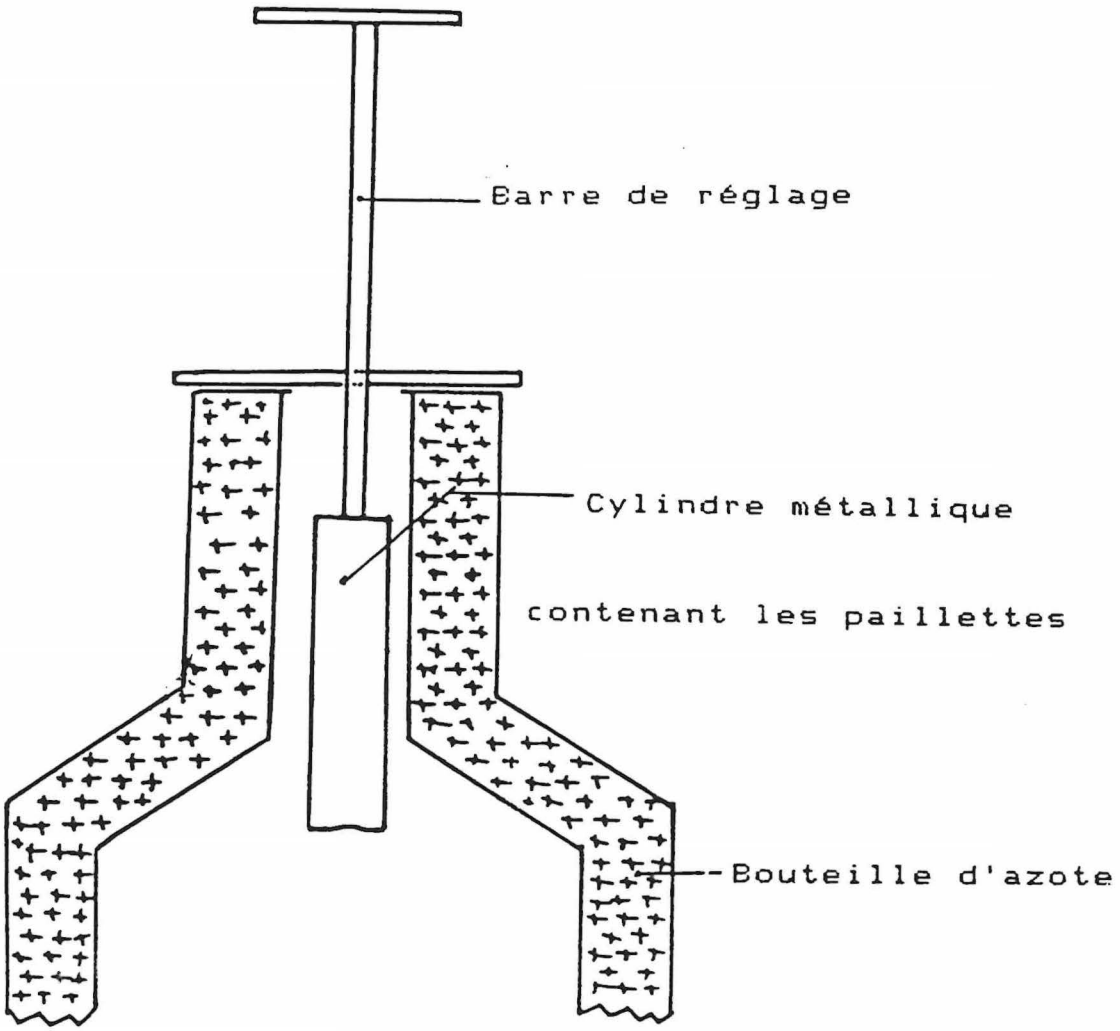


Tableau n° I : Répartition des embryons en vue d'étudier la survie in vitro des demi-embryons.

Traitement	Nbre embryons	Influence observée
Ebr entier Frais	33	Comparaison entre l'état Frais/Congelé
Demi-Ebr Frais	57	l'état Entier/bisséqué
Ebr entier Congelé	28	Etude des intéractions entre groupes
Demi-Ebr Congelé Sans culture	24	Influence d'une Culture de 4 h sur la survie du demi-embryon Congelé
Demi-Ebr Congelé Après culture	44	

b) Méthode de culture :

Les embryons et les demi-embryons ont été cultivés pendant 24 à 48 heures dans du HAM F10 auquel on a additionné 20 p.100 de sérum de veau foétal décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes.La culture s'est effectuée sous atmosphère gazée (5p.100 de CO2) à 37°C.

Les embryons entiers ont été placés dans de petites boîtes de Pétri (FALCON n°1008),alors que les demi-embryons,difficilement identifiables en raison de leurs faibles dimensions et de l'absence de membrane pélucide,ont été mis en culture sur micro-plaques (Fond U 96 trous NUNC).

c) Jugement de viabilité des embryons :

α) Jugement des embryons après décongélation :

Les embryons et les demi-embryons sont notés après décongélation de 1 à 3 suivant leur aspect morphologique à la loupe binoculaire (grossissement 80) [NIKON ASM Z10].

• Classe 1 : Embryon et demi-embryon de bonne qualité,
- masse cellulaire compacte
- cellules homogènes
- absence de cellule détachée
- couleur homogène et claire

• Classe 2:Embryon et demi-embryon de qualité moyenne, même aspect général que les embryons de classe 1 avec quelques défauts
- contour ± irrégulier
- cellules échappées
- couleur hétérogène

• Classe 3 : Embryon et demi-embryon dégénérés,
- forme irrégulière
- nombreuse cellules échappées
- cellules en dégénérescence (noyaux picnotiques,vacuolisation cellulaire)

β) Jugement après culture :

Le jugement du développement s'est effectué par l'observation de l'aspect morphologique à la loupe binoculaire (grossissement 80) [NIKON ASM Z10] à trois périodes distinctes:

- 4 heures de culture pour la catégorie de demi-embryons congelés après culture,,
- 24 et 48 heures de culture pour toutes les catégories d'embryons,

On distingue trois classes d'embryons notées (+) (±) et (-),

• Classe (+) : Développement,
Embryon entier:
- présence d'un bouton embryonnaire compact
- stade plus avancé de développement
- absence de signe de dégénérescence

Demi-embryon :
- développement d'un blastocoele
- absence de signe de dégénérescence

• Classe (±) : Etat stationnaire,
Absence de signe de dégénérescence,mais aucun signe de développement,

• Classe (-) : Dégénérescence,
Signe de dégénérescence:
- forme irrégulière
- cellules échappées
- dégénérescence cellulaire

Remarque; pour l'étude statitique,on a regroupé deux classes;les embryons développés (+) et les embryons peu ou pas développés (+/- , -).

6) Analyse statistique :

Le traitement statistique des données a été réalisé à l'aide du test du X2 (Schwartz 1963).

II RESULTATS :

Les résultats seront présentés sous forme de tableaux et de figures.

Un premier tableau (n°II) rapporte l'ensemble des données puis,nous examinerons le détail des résultats,c'est à dire :

- Le degré de développement après 4 heures de culture.
- L'aspect des embryons après décongélation.
- Le degré de développement après 24 et 48 heures de culture.

1) Présentation générale des résultats :

Le tableau n°II nous rapporte la survie des différentes classes d'embryons frais et congelés après 24 et 48 heures de culture.
Dans ce tableau ,figurent aussi le niveau de développement des demi-embryons après 4 h de culture ainsi que l'aspect des embryons après décongélation.

2) Développement du demi-embryon de souris après 4 h de culture :

Tableau n°III : Développement du demi-embryon après 4 h de culture.

Niveau de développement	Proportion d'embryons en pourcentage
(+) : Embryons développés	42 p.100 (37/88)
(+) : Développement stationnaire	56 p.100 (56/88)
(-) : Embryons dégénérés	2 p.100 (2/88)

Une forte proportion d'embryons (92 p.100) a survécu à l'épreuve de la bissection.Plus de quarante pourcent d'entre eux se sont nettement développés en présentant après 4 heures de culture ,un blastocoele visible et un bouton embryonnaire compact.

Tableau n°II : Viabilité des embryons .

Evaluation du taux de survie et de développement des différents goupes d'embryons.(En p.100)

PERIODE D'OBSERVATION	EMBRYON ENTIER FRAIS	EMBRYON ENTIER CONGELE	DEMI-EMBRYON FRAIS	DEMI-EMBRYON CONGELE SANS CULTURE	DEMI-EMBRYON CONGELE APRES 4 h DE CULTURE
Après 4 heures de culture					(+);42 [37/88] (±);56 [56/88] (-);2 [2/88]
Après décongélation		(1);61 [17/28] (2);25 [7/28] (3);14 [4/28]		(1);17 [4/24] (2);83 [20/24] (3);0 [0/24]	(1);52 [23/44] (2);30 [13/44] (3);18 [8/44]
Après 24 heures de culture	(+);79 [26/33] (±);3 [1/33] (-);18 [6/33]	(+);19 [5/26] (±);35 [9/26] (-);46 [12/26]	(+);65 [37/57] (±);7 [4/57] (-);28 [16/57]	(+);10 [2/20] (±);35 [7/20] (-);55 [11/20]	(+);31 [12/39] (±);21 [8/39] (-);49 [19/39]
Après 48 heures de culture	(+);52 [17/33] (±);6 [2/33] (-);42 [14/33]	(+);4 [1/26] (±);38 [10/26] (-);58 [15/26]	(+);25 [9/36] (±);0 [0/36] (-);75 [27/36]	(+);0 [0/20] (±);15 [3/20] (-);85 [17/20]	(+);5 [2/39] (±);8 [3/39] (-);87 [34/39]

Aspects des embryons après décongélation :

(1) : Embryons de qualité 1 (excellent) ou 2 (bon),
(2) : Embryons de qualité 3 (moyen),
(3) : Embryons de qualité 4 (dégénéré),

Niveaux de développement des embryons après culture :

(+) : Développement de l'embryon,
(±) : Etat stationnaire,
(-) : Dégénérescence de l'embryon,

3) Aspect des embryons de souris après décongélation :

Tableau n°IV : Appréciation de l'aspect morphologique des embryons congelés au moment de la décongélation.

Aspect morphologique	Embryon entier	Demi-embryon sans culture	Demi-embryon 4 h culture	Total
(1)	61 % (17/28)	17 % (4/24)	52 % (23/44)	44
(2) ou (3)	39 % (11/28)	83 % (20/24)	48 % (21/44)	52
Total	28	24	44	96

Nous avons décidé de regrouper les catégories 2 et 3,la limite séparant ces deux types d'embryons étant parfois difficile à déterminer.

L'analyse statistique (test du X2) montre ($p<0,01$, $X2;11,47$ DDL:2) que l'aspect morphologique des embryons après décongélation n'est pas le même selon la nature du traitement qui lui a été appliqué.

En comparant les classes deux à deux,le test du X2 révèle que :

- l'embryon entier,avec un taux de survie de 61 p.100 (embryon de type (1)) supporte mieux la congélation que les demi-embryons dont le niveau de survie n'atteint que 17 et 52 p.100 (X2;11,5 DDL:2 $p<0,01$)

- 4 h de culture avant la congélation améliore de manière significative la survie du demi-embryon,ce qui se traduit par un taux plus important de demi-embryons de type (1) après décongélation (52 p.100 pour les embryons congelés après 4 h de culture et 17 p.100 pour le lot témoin des embryons congelés sans culture).

4) Survie des embryons et demi-embryons après 24 et 48 heures de culture :

a) Influence d'une période de 4 heures de culture avant congélation sur la survie du demi-embryon :

Tableau n°V ; Influence d'une période de culture de 4 heures sur la survie du demi-embryon congelé .

CULTURE \ NIVEAU DE SURVIE	POURCENTAGE DE SURVIE DU DEMI-EMBRYON CONGELE SANS CULTURE	POURCENTAGE DE SURVIE DU DEMI-EMBRYON CONGELE APRES CULTURE	Nombre total d'embryon
24 heures (+)	10 p,100 [2/20]	31 p,100 [12/39]	14
(±) ou (-)	90 p100 [18/20]	69 p100 [27/39]	45
48 heures (+)	0 p,100 [0/20]	5 p,100 [2/39]	2
(±) ou (-)	100 p,100 [20/20]	95 p,100 [37/39]	57

Remarque ; (+) ; bon développement de l'embryon ou du demi-embryon,
(±) (-) ; développement stationnaire ou dégénérescence,

Après 24 h de culture,31 p,100 des embryons cultivés avant congélation se sont développés alors que ce taux n'atteint que 10 p,100 dans le lot témoin,Néanmoins ,l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative entre ces deux classes (X2;2,0, DDL;1 ,p>0,5).

L'analyse statistique,à l'aide du X2 amélioré par la correction de Yates (petits échantillon),des résultats de survie après 48 heures de culture aboutit à la même conclusion,Il n'existe aucune différence significative entre les deux groupes d'enbryons,(X2≃0,DDL;1,p>0,5).

On peut donc assimiler ces deux groupes de demi-embryons à une même et unique classe,Le niveau de

survie calculé à 24 et 48 h représente celle du demi-embryon congelé.

b) Appréciation des paramètres déterminant la survie des embryons de souris :

Il nous a paru intéressant d'analyser la survie des embryons à partir de 24 heures de culture en tenant compte de l'action de trois paramètres (la congélation, la durée de culture et la bissection) ainsi que leurs intéractions réciproques.

Nous exposerons en premier lieu les résultats globaux de survie après 24 et 48 heures de culture pour nous intéresser ensuite à l'effet des différents facteurs déterminants.

α Présentation des résultats de survie après 24 à 48 heures de culture :

Nous trouvons dans le tableau n°VI le taux de survie des différentes classes d'embryons après 24 et 48 heures de culture.

A 24 heures de culture le niveau de survie des embryons entiers frais est de 79 p.100 alors qu'il atteint seulement 19 p.100 chez l'embryon congelé. Lorsqu'on examine le niveau de survie des demi-embryons, on constate que le demi-embryons frais avec un taux de survie de 65 p.100 , se développe mieux que le demi-embryon congelé (24 p.100 de survie).

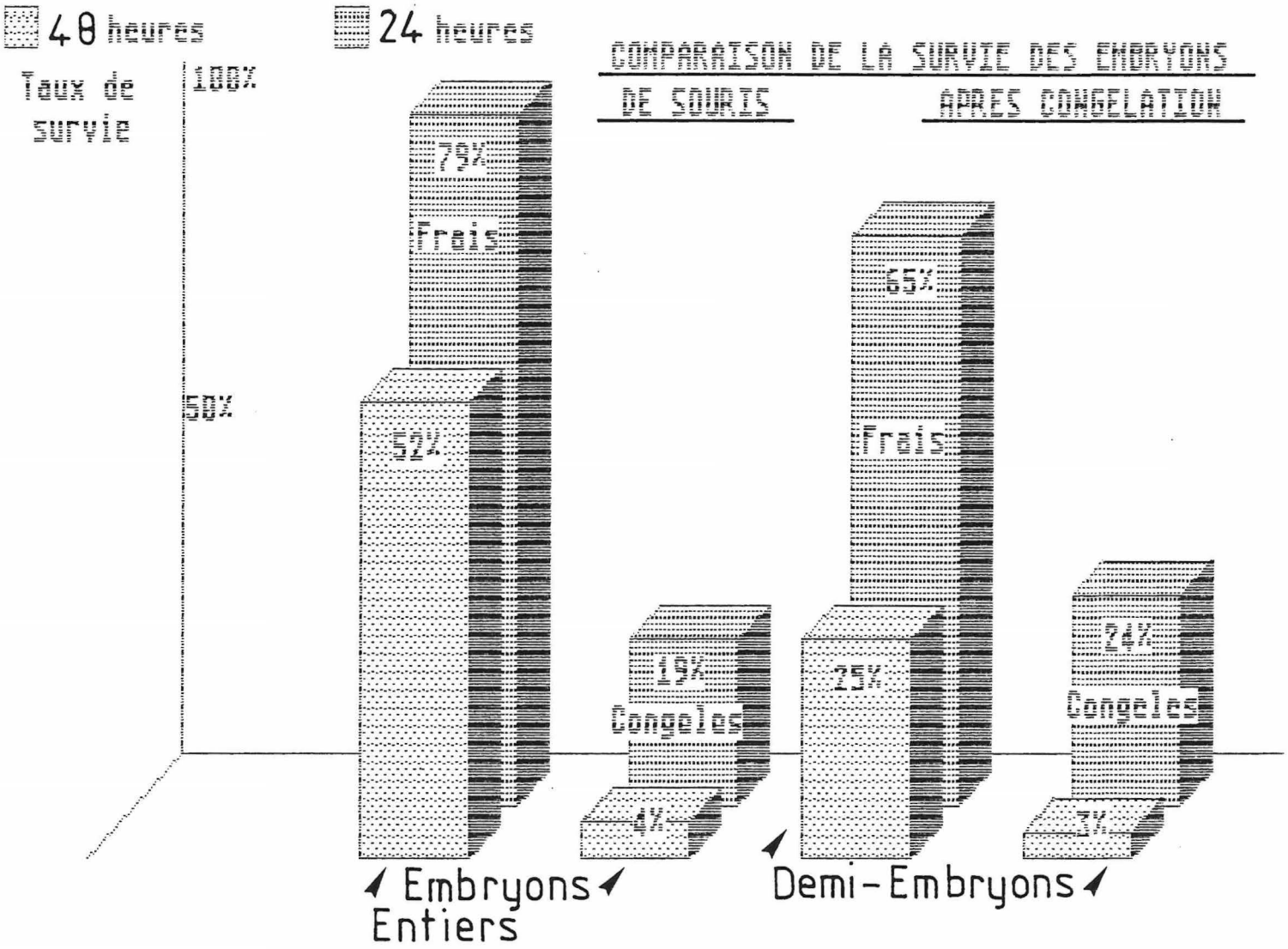
La figure n° 4 illustre les résultats précédents

* Tableau n°VI : Survie des embryons après 24 et 48 heures de culture.

DUREE DE CULTURE EN HEURES	EMBRYON ENTIER FRAIS		EMBRYON ENTIER CONGELE		DEMI-EMBRYON FRAIS		DEMI-EMBRYON CONGELE	
	%	N	%	N	%	N	%	N
24	78,8	(26/33)	19,0	(5/26)	64,5	(37/57)	23,7	(14/59)
48	51,5	(17/33)	3,8	(1/26)	25,0	(9/36)	3,4	(2/59)

L'existence de différences significatives, dues aux traitements, entre classes d'embryons , sera abordée dans le prochain paragraphe.

Figure n°4


48 heures
24 heures
COMPARAISON DE LA SURVIE DES EMBRYONS
DE SOURIS
APRES CONGELATION
Taux de survie
100%
50%
79%
Frais
52%
19%
Congelés
4%
65%
Frais
25%
24%
Congelés
3%
Embryons Entiers
Demi-Embryons

B) Influence de la congélation, de la bissection et de la culture sur la survie de l'embryon de souris :

* Influence de la congélation et de la bissection sur la survie des embryons à 24 et 48 heures :

Tableau n°VII : Influence de la congélation et de la bissection sur la survie des embryons.

		24 HEURES DE CULTURE		48 HEURES DE CULTURE		TOTAL	
		%	N	%	N	%	N
CONGELE	EMBRYON ENTIER	19	(5/26) a	4	(1/26) e	11	(6/52) i
	DEMI EMBRYON	24	(11/59) b	3	(2/59) f	14	(16/118) j
FRAIS	EMBRYON ENTIER	79	(26/33) c	52	(17/33) g	65	(43/66) k
	DEMI EMBRYON	65	(37/57) d	25	(9/36) h	50	(46/93) l

(a + b)vs(c + d) S p<0,001 ; (e + f)vs(g + h) S p<0,001 ; (i + j)vs(k + l) S p<0,001

(a + c)vs(b + d) NS ; (e + g)vs(f + h) S p<0,01 ; (i + k)vs(j + l) S p<0,05

S ; Différence significative

NS ; Différence non significative

Après 24 heures de culture, nous avons observé un effet très significatif (X2;39,8) de la congélation sur la survie de l'embryon entier et du demi-embryon, alors que l'effet de la bissection ne semble jouer aucun rôle à ce niveau (X2;1,15).

Après 48 heures de culture, l'analyse statistique des résultats montre que la totalité des différences s'explique aussi bien par la congélation (X2;29,1) que par la bissection (X2;8,5).

* Influence de la durée de culture et de la congélation sur la survie de l'embryon et du demi-embryon :

		EMBRYON ENTIER %	N	DEMI-EMBRYON %	N	TOTAL %	N
CONGELE	24 heures CULTURE	19	(5/26) a	24	(14/59) e	22	(19/85) i
	48 heures CULTURE	4	(1/26) b	3	(2/59) f	4	(3/85) j
FRAIS	24 heures CULTURE	79	(26/33) c	65	(37/57) g	70	(63/90) k
	48 heures CULTURE	52	(17/33) d	25	(9/36) h	38	(26/69) l

(a + b)vs(c + d) S p<0,001 ; (e + f)vs(g + h) S p<0,001 ; (i + j)vs(k + l) S p<0,001

(a + c)vs(b + d) S p<0,05 ; (e + g)vs(f + h) S p<0,001 ; (i + k)vs(j + l) S p<0,001

S ; Différence significative

Les différences observées s'expliquent tant par le facteur congélation que par la durée de mise en culture.

La congélation apparaît de nouveau comme un facteur puissant (X2 24,4 DDL:2) expliquant les différences de survie constatées entre embryons entiers frais et congelés à 24 heures (79 vs 19 p.100) et à 48 heures (52 vs 4 p.100).

Cette analyse souligne l'importance de la durée de la mise en culture.Quelque soit la classe de l'embryon (Entier,demi-embryon ou embryons totaux) l'allongement de la durée de mise en culture s'accompagne d'une diminution de la survie de l'embryon.

Aucune interaction n'a été décelée entre ces deux facteurs, la congélation et la durée.

* Influence de la durée et la bissection sur la survie de l'embryon et du demi-embryon :

		ENBRYON FRAIS		ENBRYON CONGELE		TOTALE	
		%	N	%	N	%	N
24 HEURES DE CULTURE	EMBRYON ENTIER	79	a (26/33)	19	e (5/26)	53	i (31/59)
	DEMI EMBRYON	65	b (37/57)	24	f (14/59)	44	j (51/116)
48 HEURES DE CULTURE	EMBRYON ENTIER	52	c (17/33)	4	g (1/26)	31	k (18/59)
	DEMI EMBRYON	25	d (9/36)	3	h (2/59)	12	l (11/95)
		(a + b)vs(c + d) S p<0,001		(e + f)vs(g + h) S p<0,001		(i + j)vs(k + l) S p<0,001	
		(a + c)vs(b + d) S p<0,05		(e + g)vs(f + h) NS		(i + k)vs(j + l) S p<0,05	

S ; Différence significative
NS ; Différence non significative

Ce dernier tableau évalue l'effet de la durée de culture et de la bissection sur la survie de l'embryon frais et congelé.

L'analyse statistique des données confirme les constatations des tableaux précédents ;il souligne l'importance de la durée de mise en culture,qui apparaît comme un des facteurs expliquant la variabilité des niveaux de survie des différentes classes d'embryons.A l'opposé,l'effet de la bissection ne se fait sentir que chez les embryons frais après 24 heures (79 vs 65) et 48 heures (52 vs 25).Le niveau de survie des embryons congelés n'est apparemment pas déterminé par leur bissection.(X2;0,13 DDL;2)

Conclusion : L'observation des taux de survie après 24 et 48 heures de culture montre que :

• Le niveau de survie des différentes classes d'embryons est par ordre décroissant de :

Après 24 heures de culture
- embryon entier frais 79 p.100
- demi-embryon frais 65 p.100
- embryon entier congelé 24 p.100
- demi-embryon frais 19 p.100

Après 48 heures de culture
- embryon entier frais 52 p.100
- demi-embryon frais 25 p.100
- embryon entier congelé 4 p.100
- demi-embryon congelé 3 p.100

• L'analyse statistique rapporte l'effet des principaux facteurs déterminant le niveau de survie des embryons.Par ordre décroissant nous trouvons :

(1) La congélation est un facteur puissant expliquant les différences de niveau de survie constatées entre embryons entiers frais et congelés (79 vs 19 p.100 à 24h ,52 vs 4 p.100 à 48h) et demi-embryons frais et congelés (65 vs 24 p.100 à 24h,25 vs 3 p.100 à 48h).

(2) L'effet de la durée de mise en culture est un facteur puissant;son effet ressort moins sur les embryons entiers frais (79 vs 52 p.100 à 24 et 48h) ou congelés (19 vs 4 p.100 à 24 et 48h) que sur les demi-embryons frais (65 vs 25 p.100 à 24 et 48h) ou congelés (24 vs 3 p.100 à 24 et 48h).

(3) L'effet de la bissection ne se fait ressentir qu'après 48 heures de culture.Elle explique les différences de survie observées entre embryons et demi-embryons frais (52 vs 25 p.100) ou congelés (4 vs 3 p.100).Son effet apparaît par ailleurs plus important sur l'embryon frais (52 vs 25 p.100) que sur l'embryon congelé (4 vs 3 p.100).

III DISCUSSION :

La discussion portera dans un premier temps sur la partie "Matériel et Méthodes",Nous nous intéressons ensuite aux résultats de survie qui ont été observés.

1) Matériel et méthode :

a) Matériel animal :

Les souris utilisées proviennent de lignées différentes.

Certains auteurs [Schmidt (1985) ,Whitten (1968)] ont néanmoins remarqué que ce facteur est capable de modifier le degré de développement in vitro des embryons.

Les embryons sélectionnés sont des jeunes blastocystes ou des blastocystes épanouis de qualités 1 et 2.D'après Williams (1984) cela correspond au stade idéal pour pratiquer la bissection de l'embryon de souris.

b) Technique de bissection :

La technique qui fut utilisée dérive de celle mise au point par Williams (1982),elle diffère de celle de Nagashimah (1984) qui utilise simplement une micro-aiguille pour couper l'embryon après avoir partiellement digéré la zone pellucide.

Contrairement à Scripongpun (198) la position du micro-scalpel est perpendiculaire à la micro-pipette est non dans son axe.

Les demi-embryons n'ont pas été remis dans leur zone pellucide après bissection.Certains auteurs [Nieman (1986),Picard (1984),Ysunoda (1987)] ont montré que l'on obtient un meilleur taux de survie en replaçant le demi-embryon dans sa pellucide ou dans de l'agar avant de la congeler.Ici il nous a semblé intéressant d'examiner la survie du demi-embryon congelé sans pellucide car cela se rapproche des conditions de terrain où l'on essaye de limiter le nombre de manipulation des embryons.

c) Technique de culture :

Les embryons ont été cultivés dans du HAM F10 enrichi avec 20 p.100 de sérum de veau foetal pendant 24 à 48 heures.

Le HAM est un milieu adéquat pour la culture de l'embryon de souris.D'après Ladd (1983) il est possible d'obtenir des niveaux de développement comparable (75 p.100 de de survie après 24 h de culture dans du HAM avec des embryons frais) avec des milieux plus simples que le HAM comme du PBS supplémenté avec 15 à 20 p.100 de sérum de veau foetal.

Si la durée de mise en culture (24 à 48 h) permet d'apprécier le développement des embryons entiers,elle serait excessive pour le demi-embryon.Picard (1984) rapporte que le demi-embryon bovin dégénère rapidement après 10 à 12 heures de culture.Baker (1985) propose pour juger la survie du demi-embryon frais,une durée de culture limitée à 18-24 heures..

d) Appréciation de la survie après décongélation :

L'appréciation du développement du demi-embryon fut basée sur la recherche de la présence d'un blastocoele et d'un bouton embryonnaire compact.Ces deux critères doivent s'observer conjointement d'après Mc Evay (1987) pour qualifier le demi-embryon de, développé.

Renard (1978) souligne néanmoins la précarité de ce type de jugement.Il existe en effet d'autres méthodes permettant d'apprécier le degré de développement des embryons.Picard (1984) propose de fixer les embryons et de juger leur viabilité en comptant le nombre de noyaux picnotiques.D'autres auteurs préconisent l'usage de tests biochimiques,Linda (1980) et Low (1986) recommandent par exemple l'utilisation d'un test à la fluoresceine.

2) Résultats :

a) Aspect des embryons après décongélation et élimination du cryoprotecteur :

Soixante et un p.100 des embryons entiers sont classés dans la catégorie 1 après décongélation et élimination du cryoprotecteur.Cette valeur est inférieure à celle que l'on trouve dans la littérature où le niveau de survie après décongélation varie de 70 à 80 p.100 [Miyamoto (1977),Rall (1984), Takeda (1982)].

b) Niveau de développement après 24 et 48 heures de culture :

Le développement des embryons entiers est de 19 p.100 après 24 heures de culture et de 4 p.100 au bout de 48 heures.

Herrera (1985) et Takeda (1982) nous rapportent un taux de développement de 45 et 46 p.100 après 24 heures de culture;après 48 heures les valeurs affichées dans la littérature sont beaucoup plus dispersées,elles varient de 13 p.100 (d'Avout 1980) à 65 p.100 (Whittingham).

D'une manière générale nos résultats apparaissent plus faibles que ceux que l'on trouve dans la littérature.L'explication provient sans doute de la sévérité de notre jugement où seuls les embryons classés (+) ont été retenus.En sélectionnant les embryons de type (+) et (±) (développés et stationnaires) on aurait obtenu des résultats (54 p.100 à 24 h et 42 p.100 à 48h) comparables avec ceux de la littérature.

La mise en culture pendant 4 heures de demi-embryons avant d'être congelés a un effet limité.Si après décongélation et élimination du glycérol le niveau de survie est significativement plus élevé que dans le lot témoin (52 vs 17 p.100),l'effet diminue rapidement,la différence de survie entre les deux groupes n'étant plus significative au bout de 24 heures de culture (31 vs 10 p.100).

Si ces résultats concordent en partie avec ceux de Chesné (1987),l'analyse statistique des résultats confirme que la durée de mise en culture a été excessive [Picard (1984),Baker (1985)],masquant l'effet de certains facteurs tels,la mise en culture avant congélation ou l'effet de la bissection.

Conclusion :

• Quatre heures de mise en culture avant congélation améliore la survie du demi-embryon après décongélation et retrait du cryoprotecteur.
Néanmoins l'effet de ce traitement tend à diminuer pour disparaître au bout de 24 heures de culture.

• Le niveau de survie après 24 et 48 heures de culture est de :

* 24 heures de culture
- embryon entier frais 79 p.100
- demi-embryon frais 65 p.100
- embryon entier congelé 24 p.100
- demi-embryon frais 19 p.100

* 48 heures de culture
- embryon entier frais 52 p.100
- demi-embryon frais 25 p.100
- embryon entier congelé 4 p.100
- demi-embryon congelé 3 p.100

• Trois types de facteurs déterminent le niveau de survie des embryons.Leurs actions s'exercent de manière indépendante.Par ordre décroissant nous trouvons :

(1) La congélation.

(2) La durée de mise en culture,dont l'effet ressort moins sur l'embryon entier que sur le demi-embryon.

(3) L'effet de la bissection ne se fait ressentir qu'après 48 heures de culture.Son effet apparaît par ailleurs plus important sur l'embryon frais que sur l'embryon congelé.

• Il seraît intéressant à l'occasion d'études ultérieures de mener ce type d'expérience en contrôlant le développement des demi-embryons avant 24 heures de culture (6 12 et 24 heures par exemple).En effet au delà de cette période,l'influence d'une culture de 4 heures semble être masquée.

Références bibliographiques.

d'AVOUT M.S. (1980) ; La congélation de l'embryon de souris,possibilité d'application dans la conservation à long terme de l'embryon de bovins.Mémoire de DEA de Biologie animale.Paris VI.

BAKER R.D. (1985) ; Commercial splitting of bovine embryos.Theriogenology 23 (1) 3.

CHESNE P.,HEYMAN H.,CHUPIN,,PROCUREUR R.,MRNRZO Y. (1987) ; Freezing cattle demi-embryos:influence of a period of culture between splitting and freezing on survival,,Theriogenology. 27 (1) 218.

HERERA ALVAREZ H. (1985) ; Contributiuon à l'étude de la production et de la congélation d'embryons chez les bovins.Mémoire de maîtrise es-science vétérinaire ENVA Alfort.

Heyman Y. (1986) ; Advances in the techniques of freezing of domestic mammal embryos.In "Séminaire sur la congélation des embryons et des ovocytes",Annecy Juin 1986.collection Marcel Mérieux.151-163.

INRA (1980) ; Blastographie du développement précoce de l'embryon bovin superovulé.El.et Ins. 178 28 pages.

KASAI M.,NIWA K.,IRITANI A. (1980) ; Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly.J.Reprod.Fert. 59 51-56.

LADD P.C.,HANCOCK J.A.,JONES B.K.,SNYDER D.A. (1983) ; Development of early embryos in HAM'S F10,BMOC-3,and phosphate-buffered saline media,,Theriogenology 19 (1).

MOHR L.R.,TROUNSON A.O. (1980) ;The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. J.Reprod.Fert. 58 189-196.

LOW B.G.,TAKAWASHI Y.,KANAGAWA H. (1986) ; Viability of frozen-thawed mouse blastocysts with differents number of dead cells,,Theriogenology 25 (5) 675-680.

MC EVAY G.,SREEMAN J.M. (12987) ; The survival of bissected cattle embryos without zonae pellucidae. Theriogenology.27 (1) 257.

MIYAMOTO H.,ISHIBASHI T. (1977) ; Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol.J.Reprod.Fert. 50 373-375.

NAGASHIMAH H.,MATSUI K.,SAWASAKI T. (1984) ; Production of monozygotic mouse twins from micro-surgically bisected morula.J.Reprod.Fert. 70 357-362.

NIEMAN H.,BREM G.,SACHER B.,SMIDT D. et coll. (1986) : An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos.,Theriogenology. 25 519.

PICARD L.,KING W.A.,BETTERIDGE K.J. (1984) : Cytological studies of bovine half-embryos. . Theriogenology. 21 (1) 252.

RALL W.F.,POLGE C. (1984) : Effect of wrarming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. J.Reprod.Fert.70 285-292.

RENARD J.P.,MENEZO Y. et coll. (1978) : Attemps to;predict the viability of cattle embryos produced by superovulation.In"Control of reproduction in the cow. Ed. J.R. Screenan (Galway) 398-417.

RORIE R.W.,PENDLETON R.J. et coll.(1986) : The viability of bovine half embryos produced before and after liquid nitrogen freezing.In"Future Aspects in Human In Vitro Fertilization. Ed; W.Feichtinger and P.Kemeter.Springer-Verlag, Heidelberg.

RORIE R.W.,PENDLETON R.J. et coll. (1987) : Viability of demi-embryos produced before VS. after deep freezing.,Theriogenology 25 (1) 192.

SCHMIDT P.M.,HANSEN C.T. et coll.(1985) : Viability of frozen-thawed mouse embryos is affected by genotype. Bio.Reprod. 32 507-514.

SCHARTZ (1963) : Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.Ed.Flammarion Médecine Sciences .Paris 311 pages.

SCRIPONGPUN S. (1986) : Survie in vitro et in vivo du demi-embryon bovin agé de 6 à 8 jours.Thèse de Docteur Ingénieur "Sciences et Techniques des Productions Animales".INA Paris-Grignon 108 pages.

SUZUKI T.,SHIMOHIRA S. (1986) : Viability of frozen-thawed bovine embryos bisected in sucrose;a preliminary report.,Theriogenology 26 (3) 333-339.

TAKEDA T.,ELSDEN R.P. (1982) : Comparison of cryoprotectant for freezing mouse embryos. Theriogenology.17 (1) 109.

TAKEDA T. (1987a) : Effect of thawing procedures on damage to zonae pellucidae of bovine ova frozen in plastic straws.,Theriogenology 27 (1) 284.

TAKEDA T.,HENDERSON W.B.,HASLER J.F. (1987b) : Deep freezing of split and intact bovineembryos. Theriogenology. 27 (1) 285.

WILLIAMS T.J.,ELSDEN R.P.,SEIDEL J.G.E. (1982) : Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos..Theriogenology.17 114.

WILLIAMS T.J.,ELSDEN R.P.,SEIDEL J.G.E. (1984) : Effect of embryo-age and stage on pregnancy rates from demi-embryos..Theriogenology. 21 (1) 276.

WHITTEN W.K.,BIGGERS J.D. (1968) : Complete development in vitro of the pre-implantation stages of mouse in a simple chemically defined medium. J.Reprod.Fert. 17 399-401.

WHITTINGHAM D.G. et coll. (1979) : Survival of frozen mouse after rapid thawing from -196°C .J.Reprod.Fert. 56 11-21.

YSUNODA Y.,TAKUNAGA T.,OKUBO Y.,SUGIET T. (1987) : Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisrcted embryos..Theriogenology. 28 (3) 317.

ZARA COPIE
Reproduction-Reliure
77,Rue du Cardinal Lemoine
75005-Paris TEL:46.34.74.62