

# Simplification de la méthode de préparation des embryons équins avant cryoconservation par vitrification

Fabrice Reigner<sup>1</sup>  
Florence Guignot<sup>2</sup>

## Correspondance

fabrice.reigner@inrae.fr  
florence.guignot@inrae.fr

## Résumé.

La cryoconservation d'embryons associée au transfert d'embryons est une biotechnologie de la reproduction très utile pour la filière équine. Jusqu'à présent, la technique conventionnelle utilisée nécessitait l'achat d'un matériel coûteux et un long apprentissage technique. Outre un microscope et deux micromanipulateurs, deux sortes de micropipettes reliées à des seringues à vis étaient nécessaires, une pour maintenir l'embryon sous aspiration d'air et une, sous huile. Ces contraintes rendaient cette technique difficilement utilisable sur le terrain par les centres de collectes et de transferts de la filière équine. À INRAE Nouzilly, nous avons développé une technique dont le principe est basé sur l'introduction à main levée d'une micropipette à travers la capsule de l'embryon, sous loupe. Elle est suivie du retrait du liquide blastocœlique, toujours à main levée, sous loupe, *via* cette micropipette, dite d'aspiration, sous huile, tenue par l'opérateur et reliée à une seringue à vis. Cette technique a fait l'objet d'une déclaration d'invention et d'innovation. Nous avons montré qu'elle pouvait être facilement prise en main par un technicien de laboratoire novice en micro-manipulation d'embryons et qu'elle permettait d'obtenir d'aussi bons résultats de survie embryonnaire *in vitro* que la technique conventionnelle. Ces deux atouts permettent d'envisager une utilisation aisée et efficace par les centres de collectes/transferts d'embryons équins et la filière équine en général.

## Mots-clés

Cryoconservation, embryon, équin, aspiration du blastocœle.

---

1 Inrae, UEPAO, F-37380 Nouzilly, France.

2 Inrae, UMR85-PRC, F-37380 Nouzilly, France.

# Simplification of the method to prepare equine embryos before cryopreservation by vitrification

Fabrice Reigner<sup>1</sup>  
Florence Guignot<sup>2</sup>

## Correspondance

[fabrice.reigner@inrae.fr](mailto:fabrice.reigner@inrae.fr)  
[florence.guignot@inrae.fr](mailto:florence.guignot@inrae.fr)

## Abstract.

Embryo cryopreservation combined with embryo transfer is a very useful reproductive biotechnology for the equine sector. Until now, the conventional technique used required the purchase of expensive equipment and lengthy technical training. In addition to a microscope and two micromanipulators, two kinds of micropipettes connected to screw syringes were necessary, one to hold the embryo under air suction and one under oil. These constraints made the technique difficult to use in the field by the collection and transfer centres of the equine industry. At INRAE Nouzilly, we have developed a technique based on the freehand introduction of an aspiration micropipette through the capsule of the embryo, under a stereomicroscope. This is followed by the removal of the blastocoelic liquid via the micropipette. The operation is performed under oil, with the micropipette held by the operator and connected to a screw syringe. This technique was the subject of a declaration of invention and innovation. We have shown that this technique can be easily performed by a laboratory technician without experience in embryo micromanipulation and that it can achieve results in terms of in vitro embryo survival as good as the conventional technique. These two advantages make it possible to envisage the easy and effective use of this technique by equine embryo collection/transfer centres and the equine industry in general.

## Keywords

Cryopreservation, embryo, equine, blastocoelic suction.

---

<sup>1</sup> Inrae, UEPAO, F-37380 Nouzilly, France.

<sup>2</sup> Inrae, UMR85-PRC, F-37380 Nouzilly, France.

## Introduction

En France, la mise à la reproduction de juments par transfert d'embryons est en constante augmentation depuis plusieurs années. Cette pratique est d'un intérêt majeur pour la filière équine, car elle permet de valoriser la génétique des juments de sport sans interrompre leur carrière sportive. Par contre, elle a un coût important car elle nécessite une synchronisation des cycles entre la jument donneuse et la jument receveuse, ce qui impose de disposer d'un troupeau de receveuses conséquent et engendre une charge de travail très importante pour un centre de collectes/transferts. Pour pallier ce problème, il est possible de différer le transfert de la collecte de maximum 24 heures grâce à la réfrigération des embryons, ou mieux, de façon illimitée dans le temps et l'espace, grâce à la cryoconservation des embryons. En effet, la cryoconservation permet d'arrêter, à un instant choisi et aussi longtemps que désiré, tout phénomène biologique, et de conserver en cet état, à  $-196\text{ °C}$ , des cellules ou des tissus, avant leur réchauffement au moment voulu. La cryoconservation des embryons présente de nombreux avantages pour la filière équine. Elle permet de :

- réduire l'effectif du troupeau de receveuses et le nombre d'exams gynécologiques sur ces dernières, et de fait de diminuer les coûts de gestion de l'élevage et d'améliorer le bien-être des juments receveuses ;
- stocker des embryons de jeunes juments à fort potentiel génétique avant le début de leur carrière sportive et ensuite de diffuser largement, le progrès génétique, à travers le monde entier ;
- utiliser tous les cycles reproductifs des donneuses, même à l'automne, période de l'année pourtant peu favorable puisque les receveuses sont moins disponibles ;
- enfin, de réaliser les transferts à une période de l'année permettant aux futurs poulains de profiter des ressources herbagères et donc de réduire au maximum l'impact de l'élevage des équidés sur l'environnement. Enfin, pour la société civile et la cryobanque nationale, un dernier enjeu de taille est la possibilité de lutter contre l'érosion de la diversité génétique en maintenant la biodiversité des espèces et en sauvegardant des races en voie d'extinction.

Dans l'espèce équine, le développement des méthodes de cryoconservation des embryons équins s'est heurté à des difficultés techniques associées à deux particularités, intrinsèques à cette espèce. La première est la présence d'une membrane acellulaire, la capsule, entre l'embryon et

la zone pellucide gênant l'entrée des cryoprotecteurs dans l'embryon. La seconde est la présence d'une large cavité blastocœlique, de plus de  $300\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre au moment où les embryons sont collectés, 7 à 8 jours après ovulation. Cette large cavité renferme une grande quantité de liquide blastocœlique susceptible de former des cristaux lors de la cryoconservation, ce qui peut entraîner des dommages cellulaires mécaniques et diminuer fortement la viabilité des embryons. Les embryons équins de plus de  $300\text{ }\mu\text{m}$  ont donc besoin d'être vidés de leur liquide blastocœlique avant leur cryoconservation. C'est une opération très délicate qui concerne plus de 90 % des embryons équins collectés à J7/J8 post ovulation sur le terrain.

Depuis une dizaine d'années, la vitrification après réduction préalable d'au moins 70 % du volume blastocœlique par microaspiration sous microscope inversé, à l'aide d'une micropipette actionnée par un micromanipulateur est devenue la technique de choix pour cryoconserver les embryons équins qui ont une cavité de diamètre supérieur à  $300\text{ }\mu\text{m}$  (Choi *et al*, Theriogenology, 2011). En France, les premiers poulains issus de transfert d'embryons biopsiés et cryoconservés sont nés en 2014 (Guignot *et al*, JAS, 2015). Cependant, cette technique conventionnelle présente plusieurs inconvénients. Elle nécessite l'achat d'un matériel coûteux : outre le microscope et les deux micromanipulateurs, deux sortes de micropipettes en verre reliées à des seringues à vis sont nécessaires, une pour maintenir l'embryon sous aspiration d'air et une autre, sous huile, pour aspirer le liquide blastocœlique. En outre, cette technique requiert un savoir-faire très pointu, nécessitant une formation technique longue pour que les opérateurs soient opérationnels. Ces contraintes rendent cette technique difficilement utilisable sur le terrain par la filière équine.

Nous avons donc mis au point, à l'Unité de recherche Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC), centre de recherche INRAE Val de Loire, site de Nouzilly (37), en collaboration avec l'Unité expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière (UEPAO), une technique simplifiée, à prise en main rapide et peu coûteuse. Son principe est basé sur le retrait du fluide embryonnaire à main levée, sous loupe.

Cette technique, présentée ici, a fait l'objet d'une déclaration d'invention et d'innovation (DI-RV-20-0057 ; RS :GUILNOT Florence ; domaine d'innovation : ELEVAGE SUR MESURE. Aspiration manuelle du fluide blastocœlique d'embryons équins en vue de leur cryoconservation. Dépôt 11 mai 2020, validation 18 juin 2020).

## Principe de la méthode simplifiée

### Équipement

Pour réaliser cette technique, il faut disposer d'une loupe binoculaire, d'une seringue à vis sous aspiration d'huile, et d'un mandrin ou porte pipette au bout duquel sera attachée une micropipette d'aspiration en verre, reliée à la seringue à vis. La micropipette doit avoir un diamètre interne de 15  $\mu\text{m}$ , externe de 20  $\mu\text{m}$  et, à son extrémité, un angle de 20° (TransferTip® (ES), Eppendorf, Montesson, France). Il faut également disposer d'un milieu sans protéines dans lequel l'embryon sera placé durant l'aspiration. Ce milieu sans protéine va permettre à l'embryon de se coller au fond de la boîte de pétri et l'empêchera de rouler lors de l'introduction de la micropipette d'aspiration dans la cavité blastocœlique. Cette étape permet de s'affranchir de la micropipette de maintien sous aspiration d'air et du micromanipulateur auquel elle est reliée dans la technique conventionnelle.

Les Figures 1 et 2 représentent le dispositif. L'opérateur examine l'embryon sous loupe binoculaire. Une de ses mains tient le porte pipette, tandis que l'autre est placée sur la vis de la seringue. Pour comparaison, la Figure 3 représente le dispositif de la technique conventionnelle.

### Préparation des embryons

Une fois collecté, l'embryon est lavé 3 fois dans 500  $\mu\text{L}$  d'un milieu sans protéines, par exemple du Ringer Lactate (Vetoflex, Bioluz, Saint-Jean-de-Luz, France).

Après les 3 rinçages, l'embryon est déposé dans une goutte d'environ 70  $\mu\text{L}$  de ce même milieu en prenant soin qu'il ne se colle pas dans le cône en plastic du pipetman. Il est alors positionné par l'opérateur de telle sorte que son bouton embryonnaire soit placé à une position de 6 ou 12 heures sur les aiguilles d'une montre. Une fois cette étape réalisée, l'opérateur introduit à main levée la micropipette à travers la capsule et la zone pellucide de l'embryon, si cette dernière est encore présente. Elle est introduite par le dessus de l'embryon et en son centre. Une fois l'extrémité de la micropipette dans l'embryon, l'opérateur la maintient ainsi et, avec son autre main, tourne doucement la vis de la seringue pour aspirer le fluide embryonnaire. Le liquide ne remonte pas toujours instantanément. Il faut attendre quelques secondes avant d'aspirer à nouveau. Le fluide finit par sortir et l'embryon commence à se contracter. L'opérateur aspire le fluide blastocœlique jusqu'à obtenir une réduction quasi totale du volume de l'embryon.

Une fois le liquide aspiré, la micropipette d'aspiration est retirée de l'embryon. Quelques microlitres de sérum ou d'un milieu autre, mais contenant des protéines, sont ajoutés dans la goutte où se trouve l'embryon pour que celui-ci se détache du fond de la boîte. L'embryon est ensuite repris par l'opérateur et prêt à suivre le protocole de vitrification.

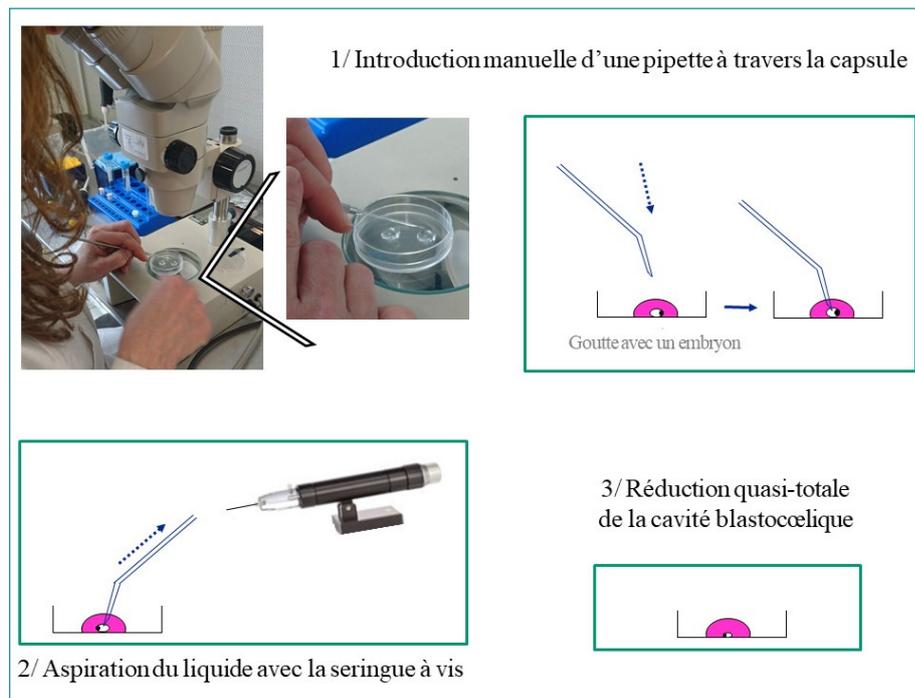


Figure 1. Dispositif d'aspiration du liquide blastocœlique équin sous loupe binoculaire. 1/ L'opérateur introduit manuellement une micropipette dans l'embryon qui se trouve dans une goutte de 70  $\mu\text{L}$  de milieu sans protéines. 2/ À l'aide d'une seringue à vis, il aspire le fluide blastocœlique. 3/ Le volume de la cavité embryonnaire se



Figure 2. Placement des mains de l'opérateur lors de l'aspiration du liquide blastocœlique. La main droite de l'opérateur tient un mandrin au bout duquel est attachée une micropipette d'aspiration en verre. Sa main gauche est posée sur la vis de la seringue qui sert à aspirer le fluide embryonnaire.

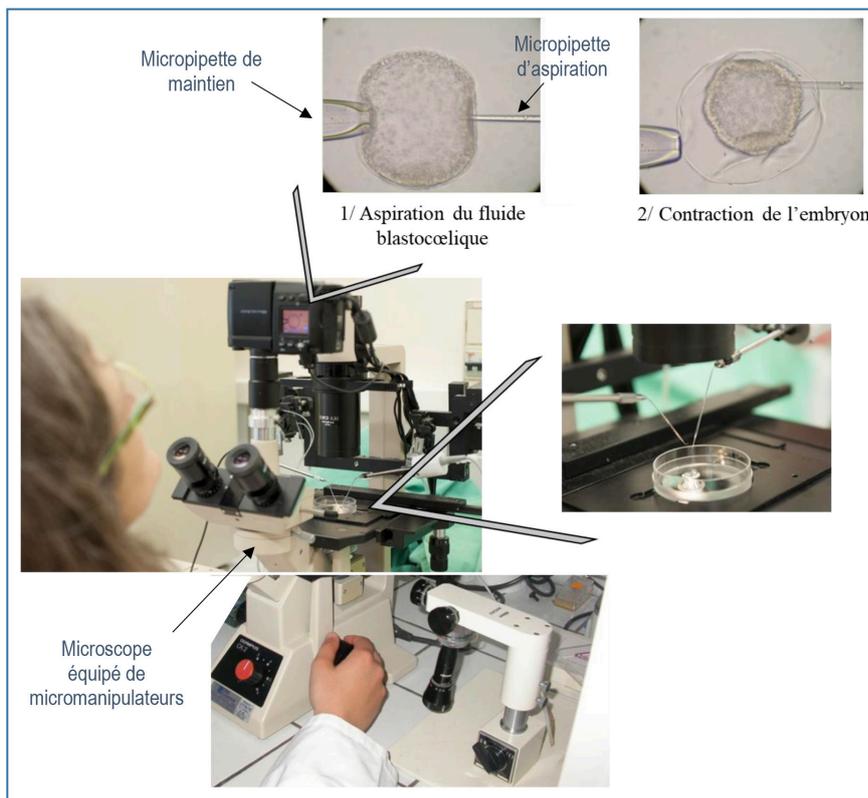


Figure 3. Dispositif d'aspiration du liquide blastocœlique équin avec la technique conventionnelle. A/ Après installation des micropipettes de maintien et d'aspiration sur les portes pipettes et réglage de leur positionnement sur le microscope *via* les micromanipulateurs, l'opérateur bloque l'embryon contre la pipette de maintien puis introduit la micropipette d'aspiration dans l'embryon. B/ À l'aide d'une seringue à vis à laquelle est reliée la micro-pipette d'aspiration, il aspire le fluide blastocœlique. C/ Le volume de la cavité embryonnaire se réduit.

## Points de vigilance

Lors de la préparation des embryons, il faut rester vigilant sur les 3 points importants ci-dessous.

### 1. Le lavage préalable des embryons dans un milieu sans protéines

Cette étape est importante et doit être réalisée avec soin pour obtenir un bon maintien de l'embryon. En effet, si

une trace de protéines subsiste dans le milieu dans lequel se déroule l'aspiration du liquide blastocœlique, les embryons risquent de rouler lors de l'introduction de la micropipette d'aspiration. Dans ce cas, il faudra relaver l'embryon dans de nouvelles gouttes de milieu sans protéines et le repositionner comme décrit précédemment avant une nouvelle tentative d'introduction de la pipette, en espérant que la première tentative n'ait pas lésé l'embryon.

## 2. Le positionnement du bouton embryonnaire et de la micropipette avant introduction de celle-ci dans la cavité de l'embryon

Le bouton ne doit être en aucun cas touché par la micropipette de l'opérateur, au risque de réduire les chances de développement de l'embryon après transfert dans une femelle receveuse. Il faut qu'il soit placé par l'opérateur de telle sorte que la micropipette ne puisse pas l'atteindre. Pour cela, il est recommandé de bien placer le bouton embryonnaire à 6 heures ou à 12 heures par rapport aux aiguilles d'une montre.

## 3. L'absence de bulle dans le circuit de la seringue à huile et dans la pipette d'aspiration

Pour avoir un contrôle parfait de l'aspiration du liquide blastocœlique, il faut prendre garde à bien purger la seringue et à n'y laisser aucune microbulle d'air. Les joints devront être soigneusement inspectés et changés si besoin. De même, avant de positionner la micropipette au bout du mandrin, faire sortir l'huile en excès afin de ne pas emprisonner d'air dans le mandrin. La micropipette sera ensuite remplie d'huile, quasiment jusqu'à son extrémité. Lors de l'introduction de la micropipette dans l'embryon, attention à ne pas expulser une microgoutte d'huile dans la cavité embryonnaire. Cette phase est un peu délicate. Cependant, en regardant sous la loupe précisément ce qui se passe, l'opérateur peut rectifier très vite et facilement les sortie/entrée d'huile avec la seringue à vis. Cette phase est également réalisée dans la technique conventionnelle.

## Applications sur les ponettes Welsh B du troupeau de Nouzilly

### Survie *in vitro* d'embryons aspirés avec la technique simplifiée versus avec la technique conventionnelle, puis cryoconservés et réchauffés

Une première expérience a été réalisée sur 21 embryons collectés sur les ponettes Welsh B du troupeau de Nouzilly à J7 post ovulation, au stade blastocyste. Leur diamètre était compris entre 188 et 555  $\mu\text{m}$  (moyenne =  $430 \pm 24 \mu\text{m}$ ). Un grade de qualité morphologique moyen de  $1,24 \pm 0,07$  a été relevé suivant la grille de notation allant de 1 à 4 (1 étant la meilleure note) établie par Mckinnon (1988). Les embryons de grade 1 sont sphériques, avec des cellules de taille, couleur et texture uniformes. Les embryons de grade 2 présentent quelques imperfections, comme des cellules isolées et une forme irrégulière. Les embryons de grade 3 présentent quelques cellules dégénérées et sont un peu contractés, tandis que les embryons de grade 4 ont de nombreuses cellules dégénérées et sont très contractés.

Ces 21 embryons ont été répartis comme suit : 11 embryons ont été mis dans le lot "main" (technique simplifiée), 8 dans le lot "micromanipulateur" (technique conventionnelle), et 2 n'ont pas été aspirés et ont servi de témoin de marquage au DAPI (Di Aminido Phenyl Indol). Ce marqueur se fixe spécifiquement sur l'ADN des cellules mortes. Les 3 lots d'embryons ainsi constitués étaient homogènes, aussi bien en termes de diamètre que de grade (Tableau 1).

Après aspiration du liquide blastocœlique, cryoconservation puis réchauffement, les embryons ont été cultivés *in vitro* durant 24 h. Après 4 h et 24 h de culture, leur diamètre a été mesuré à nouveau et leur taux de survie estimé. L'appréciation du taux de survie est basée sur l'évolution du diamètre que l'embryon a repris et sur son aspect morphologique. A 24 h, une note de grade a été attribuée aux embryons et un marquage au DAPI a été réalisé.

Les résultats de survie *in vitro* après cryoconservation des embryons puis réchauffement sont les suivants :

- les diamètres et les grades des embryons ne sont pas significativement différents entre les lots « main » et les lots « micromanipulateur ». Le diamètre des embryons des deux lots augmente entre 4 h et 24 h de survie *in vitro* indiquant une bonne viabilité des embryons pour les deux lots. À 24 h, ils ont d'ailleurs tous récupéré leur diamètre initial ;
- la variation de grade entre la collecte et les 24 h de survie *in vitro*,  $\Delta$  grade (24 h-collecte), n'est pas différente significativement entre les deux lots. Par contre, une diminution de la qualité des embryons a été observée, et ceci, de façon similaire entre les deux lots. Ces modifications morphologiques pourraient être liées aux dommages induits par la micromanipulation et à l'affaissement des embryons, en l'absence de liquide blastocœlique ;
- le taux de survie des embryons relevé après 4 h et 24 h de culture *in vitro* est déjà de 80 % dans le lot « main » (8/10 embryons) et de 62,5 % dans le lot « micromanipulateur » (5/8 embryons). À 24 h, tous les embryons ont repris leur diamètre initial et ont un bel aspect morphologique, donnant un taux de survie de 100 % (Figure 4) ;
- le nombre de cellules mortes n'est pas significativement différent entre les lots. Seule une tendance à avoir plus d'embryons avec moins de 2 à 3 cellules mortes pour les lots « main » et « témoin », et plus d'embryons avec 4 à 15 cellules mortes dans le lot « micromanipulateur » peut être notée. D'autre part, quel que soit le lot, aucun embryon n'a eu plus de 15 cellules mortes. Globalement, après 24 h de survie *in vitro*, les embryons des deux lots cryoconservés présentent un très faible nombre de cellules mortes.

**Tableau 1 : Qualité des embryons équins en fonction du traitement appliqué**

Embryons		Lot "main" (technique simplifiée)	Lot "micromanipulateur" (technique conventionnelle)	Témoin
N		11 †	8	2
Diamètre, m ± sem, µm	avant aspiration	403 ± 33,1 <sup>a</sup>	475 ± 30 <sup>a</sup>	430 ± 108 <sup>a</sup>
	à 4 h	319 ± 21,7 <sup>a</sup>	328 ± 28,3 <sup>a</sup>	/
	à 24 h	409 ± 27,9 <sup>a</sup>	472 ± 16,6 <sup>a</sup>	/
Grade, m ± sem	à la collecte	1,36 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,25 <sup>a</sup>
	à 24 h	1,70 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,15 <sup>a</sup>	/
	Δ (24h - collecte)	0,40 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,15 <sup>a</sup>	/
Survie <i>in vitro</i> , N (%)	à 4 h	8 (80)	5 (62,5)	/
	à 24 h	10 (100)	8 (100)	/
Marquage au DAPI ‡, N (%)	< 2-3 cellules	6 (60)	2 (25)	2 (100)
	4 à 15 cellules	4 (40)	6 (75)	0 (0)
	> 15 cellules	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Les embryons ont été soit aspirés manuellement sous une loupe (lot "main"), soit à l'aide du micromanipulateur sur un microscope (lot "micromanipulateur"), puis cryoconservés. Après réchauffement, ils ont été placés 24 h en survie *in vitro*. Leur diamètre et leur qualité morphologique (grade) ont été évalués à la collecte et après réchauffement. Le nombre de cellules mortes a été évalué après marquage au DAPI.

† un embryon a été perdu à la décongélation

m + sem : moyenne + erreur standard par rapport à la moyenne

‡ Marquage au DAPI réalisé à 24 h pour les embryons cryoconservés et réchauffés, et juste après la collecte pour les deux embryons témoins

a,b les chiffres avec des exposants différents pour une même ligne sont significativement différents, P < 0,05, test de Kruskal-Wallis (comparaison entre 3 lots) et de Mann et Whitney (comparaison entre deux lots)

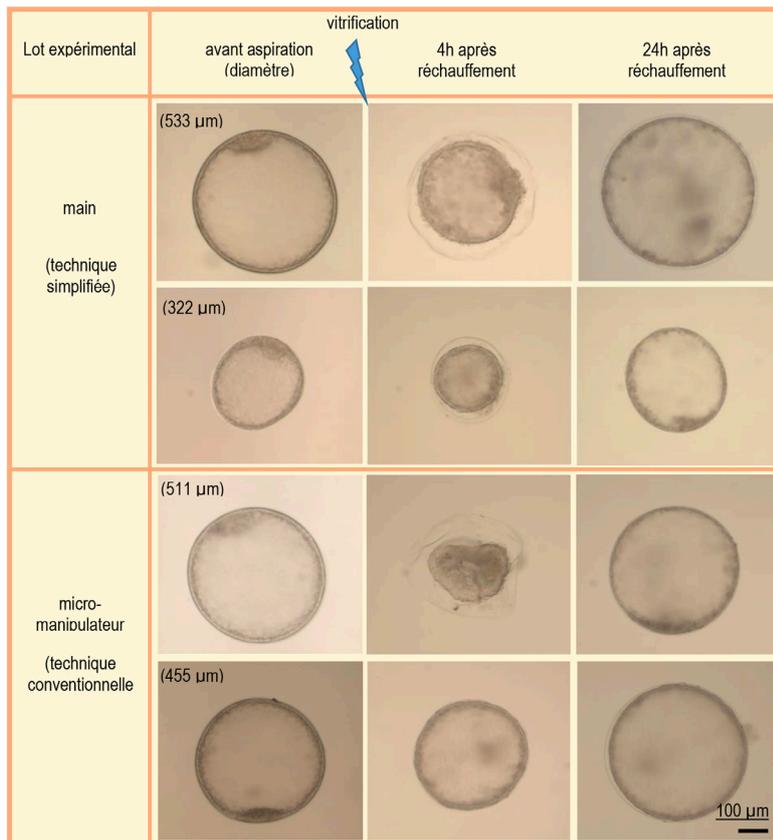


Figure 4. Embryons équins après réchauffement en fonction du traitement appliqué. Pour les deux lots expérimentaux, les embryons ont été observés en microscopie à fond clair à la collecte (= avant aspiration), puis durant leur survie *in vitro* (4 h et 24 h après réchauffement).

**Tableau 2 : Plan expérimental**

Groupe	Lot	N	Diamètre des embryons, $\mu\text{m}$	Embryons mis en survie <i>in vitro</i> (24 h)
1	expérimenté	3	< 200	3
2	expérimenté	1	> 200	1
3	inexpérimenté	6	> 200	6
4	témoin	4	> 200	0

Quatre groupes d'embryons ont été réalisés. Les embryons des groupes 1 et 2 ont été aspirés par un opérateur expérimenté, ceux du groupe 3, par un opérateur inexpérimenté en manipulation d'embryons et ceux du groupe 4 n'ont pas été aspirés (témoins). Les embryons des trois premiers groupes ont été congelés, puis cultivés 24 h *in vitro* après réchauffement.

L'ensemble de ces résultats indique que l'aspiration quasi totale du blastocœle, quelle que soit la technique utilisée, suivie de la cryoconservation, du réchauffement et de la survie *in vitro* durant 24 h des embryons n'a pas eu de conséquences délétères sur la viabilité des cellules embryonnaires.

### Transmission de la technique simplifiée

Une seconde expérience a été réalisée sur 14 embryons, toujours collectés sur les ponettes Welsh B du troupeau de Nouzilly à J7 post ovulation (11 blastocystes, 2 jeunes blastocystes et 1 morula), en impliquant cette fois, pour une partie des embryons, un opérateur inexpérimenté en micromanipulation d'embryons.

Les 11 blastocystes ont été répartis comme suit : un a été mis dans le lot « opérateur expérimenté » pour faire une démonstration de la technique et réaliser un film, 6 dans le lot « opérateur inexpérimenté » et 4 dans le lot témoins de marquage au DAPI. Les 3 plus jeunes embryons ont été traités à part, et piqués par l'opérateur expérimenté et aspirés quand cela était possible. Après cryoconservation, les embryons aspirés par l'opérateur non expérimenté, l'embryon « vidéo » et les jeunes embryons ont été réchauffés et cultivés 24 h *in vitro*. Le plan expérimental est synthétisé dans le tableau 2. Après 24 h de culture, la survie des embryons a été appréciée comme dans l'expérience précédente, en fonction de l'évolution du diamètre et de l'aspect morphologique. La viabilité des cellules a été évaluée après marquage au DAPI, et l'intégrité du cytosquelette embryonnaire, après marquage à l'alexa fluor 488 phalloïdine, qui marque les filaments d'actine et observation en microscopie confocale sur coupe optique.

Les résultats de survie *in vitro* ont été les suivants (Figures 5 et 6) :

- les 3 jeunes embryons ont tous repris leur diamètre initial, tout comme l'embryon « vidéo ». Ils avaient tous moins de 2-3 cellules marquées et un bel aspect morphologique. Ils ont été notés comme ayant survécu (100 %

taux de survie). Il en a été de même pour les 4 embryons témoins, moins de 2-3 cellules marquées au DAPI ont été observées ;

- les 3 premiers embryons aspirés par un opérateur non expérimenté ont tous dégénéré après 24 h (plus de 10 à 15 cellules marquées et diamètre initial non repris). Par contre, sur les 3 embryons suivants, deux avaient moins de 2-3 cellules marquées et avaient repris leur diamètre initial, voire augmenté de volume. Ces deux embryons ont été considérés comme ayant survécu ;
- l'étude du cytosquelette a permis de mettre en évidence un réseau de filaments d'actine continu autour des cellules des embryons témoins et cryoconservés et viables 24 h après culture, alors que des lésions sont présentes sur les embryons dégénérés. Des zones plus denses, indice de renouvellement cellulaire important, sont visibles, essentiellement dans les embryons cryoconservés viables. Les embryons dégénérés ont des noyaux fragmentés. Les photos « merge » reprennent les deux marquages (Figures 7 et 8).

L'ensemble de ces résultats de survie *in vitro* et de double marquage montre que le protocole de cryoconservation que nous avons appliqué permet d'obtenir, après 24 h de culture *in vitro*, des embryons équins viables, d'une qualité nucléaire et cytosquelettique proche de celle des embryons témoins ; cela permet donc d'envisager le transfert de ces embryons sur des femelles receveuses, pour évaluer leur survie *in vivo*.

Cette expérimentation montre également que la technique simplifiée d'aspiration du blastocœle à main levée a été rapide à acquérir par l'opérateur novice en micromanipulation d'embryons. Ces données nécessitent toutefois d'être confortées pour vérifier la facilité d'apprentissage de cette micromanipulation. La technique simplifiée pourra ainsi être utilisée par les centres de collectes et de transferts d'embryons équins, après une courte formation sur quelques embryons, contrairement à la technique conventionnelle qui, elle, nécessite plusieurs heures d'apprentissage.

Embryons	A la décongélation (diamètre)	Après culture <i>in vitro</i>	
		3h30 – 4h	24h
< 200 µm (groupe 1)	Jeune blastocyste (200 µm)		
	Jeune blastocyste (167 µm)		
	Morula (138 µm)		
> 200 µm (embryon "vidéo", groupe 2)	Blastocyste (444 µm)		

Figure 5. Embryons équins du lot "opérateur expérimenté" après cryoconservation et réchauffement. Les embryons des groupes 1 et 2 ont été observés en microscopie à fond clair à la décongélation (0 h), puis après 4 h et 24 h de survie *in vitro*. Tous ont augmenté de volume entre 0 h et 24 h.

Embryons > 200 µm	A la décongélation (diamètre)	Après culture <i>in vitro</i>	
		3h30 – 4h	24h
1 <sup>ers</sup> essais sur 3 blastocystes	(200 µm)		
	(388 µm)		
	(377 µm)		
2 <sup>ds</sup> essais, sur 3 autres blastocystes	(533 µm)		
	(366 µm)		
	(377 µm)		

Figure 6. Embryons équins du lot "opérateur inexpérimenté" après cryoconservation et réchauffement. Les embryons de ce lot ont été observés en microscopie à fond clair à la décongélation (0 h), puis après 4 h et 24 h de survie *in vitro*. Les 3 premiers embryons aspirés étaient dégénérés à 24 h. Par contre, sur les 3 suivants, 2 ont augmenté de volume entre 0 h et 24 h.

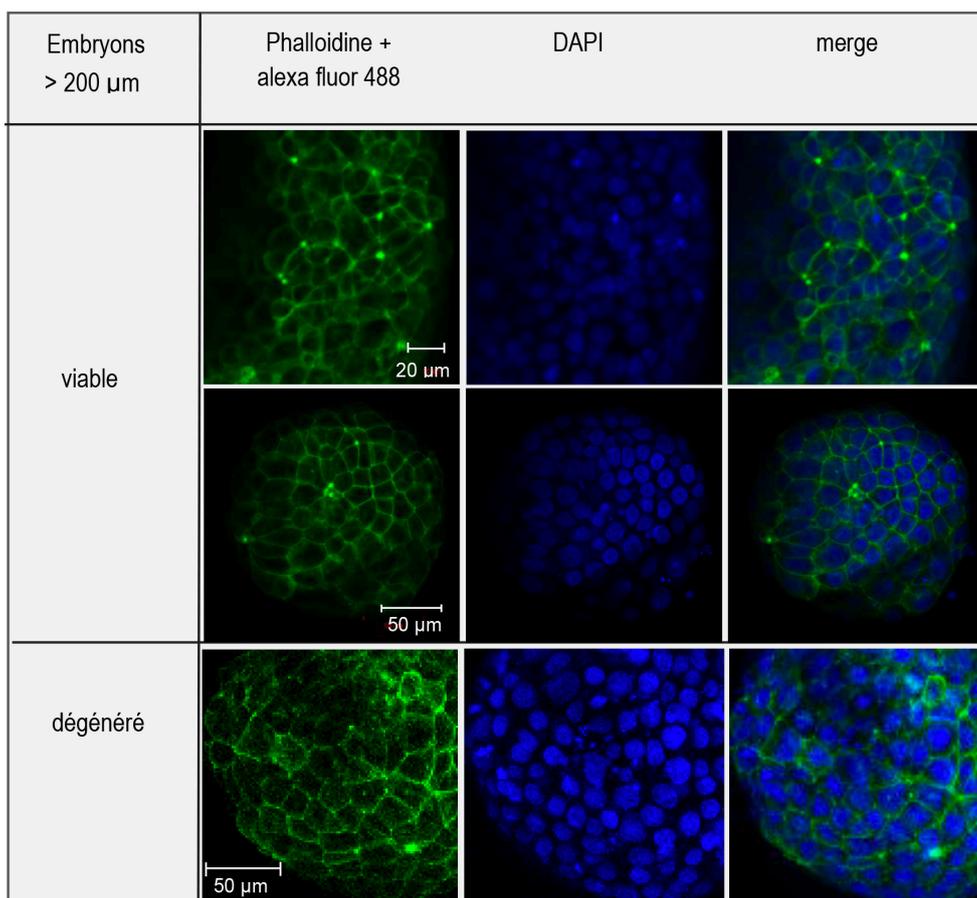


Figure 7. Embryons équins du lot "opérateur inexpérimenté" après double marquage phalloïdine/alexa fluor et DAPI. Les embryons de ce lot ont été observés en microscopie confocale à fluorescence. La colonne 1 correspond au marquage du cytosquelette (phalloïdine/alexa fluor), la colonne 2 au marquage des noyaux (DAPI) et la colonne 3 est la somme des deux marquages (*merge*). Les deux premières lignes correspondent aux deux embryons qui ont survécu à la cryoconservation. La 3<sup>e</sup> correspond à un embryon dégénéré.

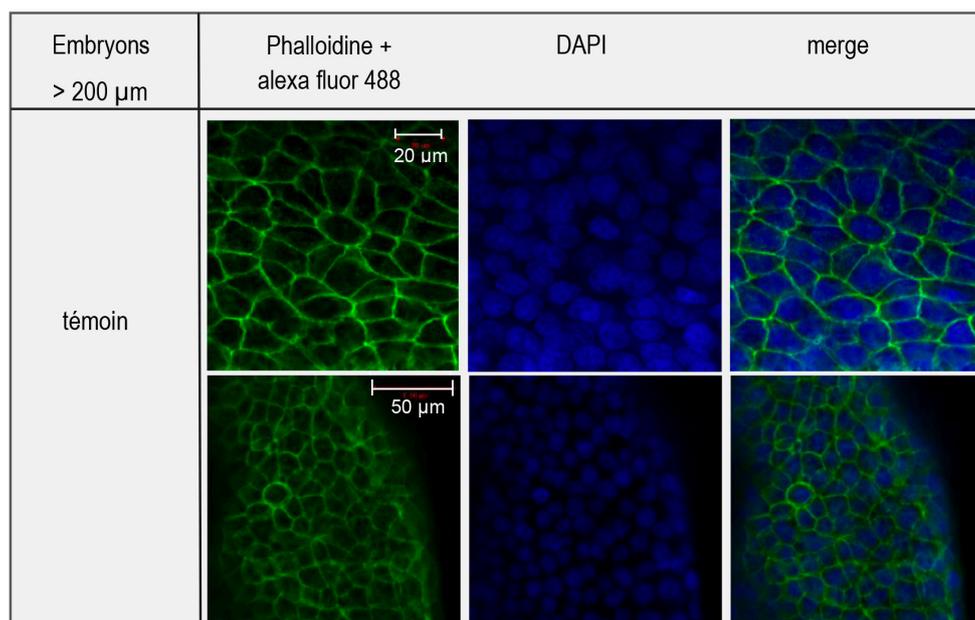


Figure 8. Embryons équins du lot "témoin" (non micromanipulés) après double marquage phalloïdine/alexa fluor et DAPI. Les embryons de ce lot ont été observés en microscopie confocale à fluorescence. La colonne 1 correspond au marquage du cytosquelette (phalloïdine/alexa fluor), la colonne 2 au marquage des noyaux (DAPI) et la colonne 3 est la somme des deux marquages (*merge*).

## Conclusion

L'application principale de la technique simplifiée, présentée ici, est la vitrification des embryons équins après aspiration à main levée du blastocœle embryonnaire. Nos expérimentations montrent que cette technique est facilement utilisable, rapidement diffusable et très compétitive ; elle est donc à la portée de tout centre de collecte et de transfert de la filière équine. Ses deux principaux avantages sont :

- **Son faible coût.** La technique simplifiée ne nécessite en effet qu'une loupe et un technicien de laboratoire sans qualification particulière en micromanipulation d'embryons ; cela permet de s'affranchir de l'achat onéreux d'un microscope équipé d'un micromanipulateur et de la longue formation à cet appareil.
- **La facilité de sa mise en place** permettra à cette technique simplifiée d'être diffusée à grande échelle sur le terrain. Elle pourrait en effet intéresser aussi bien les équipes qui travaillent déjà sur ce sujet avec la technique conventionnelle, mais également celles qui n'osent pas se lancer à cause de la lourdeur du protocole avec micromanipulateur (coût/temps). Parmi ces derniers, on peut citer les éleveurs d'équidés de travail, chevaux de trait et ânes, pour lesquels le développement de cette technique permettra de promouvoir la sauvegarde de ces races.

La technique simplifiée présente néanmoins une limite : la maîtrise du geste technique (absence de tremblement). En effet, le geste de l'opérateur doit être bien assuré au

moment où il introduit la micropipette dans l'embryon et pendant l'aspiration du liquide. Si ce geste n'est pas correctement maîtrisé, la micropipette risque de bouger et l'embryon d'être abîmé. Cela a moins de risque de se produire avec une micropipette guidée par un micromanipulateur.

La méthode simplifiée de préparation des embryons à la cryoconservation pourra aussi s'appliquer aux embryons asins. En outre, comme il est possible de génotyper des embryons à partir du liquide blastocœlique (Herrera et al, 2015), le génotypage d'embryons préparés à la cryoconservation avec la technique simplifiée est tout à fait envisageable ■

## Financements et remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier obtenu en réponse aux appels à projets lancés par l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) : nous les en remercions.

Nous tenons également à remercier l'ensemble du personnel de l'UEPAO pour l'aide technique et le soin aux animaux apportés durant toute la durée des expérimentations, et à souligner leur professionnalisme. Nous remercions également K. Reynaud pour son aide lors de l'acquisition des images en microscopie confocale sur coupe optique.

# Références

Choi, YH, IC Velez, FL Riera, JE Roldán, DL Hartman, SB Bliss, TL Blanchard, SS. Hayden and K Hinrichs (2011). "Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts." *Theriogenology* 76(1): 143-152.

Guignot, F. (2020 (18th june)). "Aspiration manuelle du fluide blastocoelique d'embryons équins en vue de leur cryoconservation." Déclaration d'Invention et de Résultats Valorisables (DIRV), INRAE DI-RV-20-0057 (Domaine d'innovation : Élevage sur Mesure): 1-18.

Guignot, F, F Reigner, C Perreau, P Tartarin, JM Babilliot, B Bed'hom, M Vidament, P Mermillod and G Duchamp (2015). "Preimplantation genetic diagnosis in Welsh pony embryos after biopsy and cryopreservation." *J Anim Sci* 93(11): 5222-5231.

Herrera, C, MI Morikawa, CB Castex, MR Pinto, N Ortega, T Fanti, R Garaguso, MJ Franco, M Castañares, C Castañeira, L Losinno, MH Miragaya and AA. Mutto (2015). "Blastocele fluid from in vitro- and in vivo-produced equine embryos contains nuclear DNA." *Theriogenology* 83(3): 415-420.

McKinnon, AO and EL Squires (1988). "Morphological assessment of the equine embryo." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192: 401-406.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.