

ifce

institut français
du cheval
et de l'équitation



43^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 16 mars 2017

Premières gestations après transfert d'embryons équins cryoconservés avec une technique simple, utilisable en condition de terrain

F. Guignot¹, M. Caillaud², G. Trinh¹, T. Blard³, P. Barrière³, J-M. Yvon³, T. Gascogne³, Y. Gaudé³, F. Stieau³, F. Reigner³

¹ Inra, UMR85 PRC, F-37380 Nouzilly, France

² Ifce, la Jumenterie du Pin, F-61310 Exmes, France

³ Inra, UE1297 PAO, F-37380 Nouzilly, France

Résumé

Depuis 2011, une technique de cryoconservation de l'embryon équin donnant de bons résultats de gestation est maîtrisée en laboratoire. Cependant, cette technique étant onéreuse et longue à maîtriser, elle est difficilement utilisable en condition de terrain. Le but de notre projet était de trouver une technique plus simple, de la tester *in vitro*, puis *in vivo* après transfert, et bien sûr d'obtenir d'aussi bons taux de gestation. Les embryons ont été produits sur des ponettes Welsh B 7 jours après ovulation. Ils ont été piqués sous loupe binoculaire, à la main, vidés à 70% de leur fluide blastocoelique par différentiel de pression osmotique, puis cryoconservés avec comme milieu de base le milieu classiquement utilisé sur le terrain pour les transferts d'embryons frais. Les embryons ont été traités ainsi juste après collecte (0h) ou après 24h de réfrigération (24h). *In vitro*, 100% (n=7) et 89% (n=9) des embryons 0h et 24h respectivement, ont repris leur développement. *In vivo*, après transfert sur jument, 2/2 embryons 0h ont donné une gestation à 30 jours, mais 0/3 embryon 24h. Après transfert sur ponette, 1/7 embryon 0h et 1/5 embryon 24h ont donné une gestation à 14 jours. Notre protocole simplifié est largement validé *un vitro*. *In vivo*, les effectifs sont à consolider sur jument avec les embryons 0h. Le temps de 24h est peut-être à réduire. Les résultats de transfert sur ponette montrent bien encore une fois la difficulté de travailler sur ce modèle.

Mots clés : Équin, embryon, vitrification, transfert

Summary

Since 2011, a technique of equine embryo cryopreservation with good pregnancy rate is available in laboratory. However, as it is an expensive and hard technique to perform, it is difficult to be applied in the field. The aim of our study was to find an easier technique, to test it *in vitro* and *in vivo*, and to obtain the same good results. Embryos were collected on pony mares at d 7 after ovulation. Pipette was introduced into embryos under stereomicroscope. Blastocoelique fluid was removed with osmotic pressure differential. Then embryos were cryopreserved with base medium used in field for fresh embryo transfer. Embryos were cryopreserved either just after collection (0h), or after 24h of refrigeration (24h). *In vitro*, 100% (n=7) and 89% (n=9) of the 0h and 24h embryos respectively, survived. After embryo transfer in full-size mare, 2/2 embryos 0h gave pregnancy at d 30, but 0/3 embryo 24h. After transfer in pony mare, 1/7 embryo 0h and 1/5 embryo 24h gave pregnancy at d 14. This simple protocol is widely *in vitro* validated. The *in vivo* study with 0h embryo transferred in full-size mare needs further transfers, but results are already very encouraging. To wait 24h before embryo cryopreservation is perhaps too long. Transfer results with pony mare well show once again the difficulty to work on this model.

Key-words: Equine, embryo, vitrification, transfer



Introduction

La transplantation embryonnaire est un puissant outil de diffusion génétique. Si elle est associée à la cryoconservation de l'embryon, il est alors possible de différer la transplantation dans le temps et dans l'espace, ce qui réduit considérablement le coût de gestion d'un troupeau de receveuses. Ce point est primordial, notamment pour l'espèce équine, pour laquelle la synchronisation des juments donneuses avec les femelles receveuses est difficile et très onéreuse. L'association de ces deux biotechnologies de la reproduction a d'autres avantages, à savoir, elle facilite le commerce et les échanges internationaux de matériel génétique en évitant le transport des animaux de haute valeur génétique. Il en découle une limitation des risques de blessures pour les animaux et des risques sanitaires pour les élevages. Certes actuellement, il est possible de transporter un embryon à l'état réfrigéré, sur une durée de 24h maximum, ce qui est déjà bien, mais rend inenvisageable un échange international. En outre, elle permet la sauvegarde d'espèces menacées via la conservation en cryobanque de la biodiversité génétique.

A la différence des espèces bovine, ovine, caprine et même chez l'homme, où la cryoconservation des embryons est maîtrisée depuis longtemps, dans l'espèce équine, elle l'est seulement depuis le début des années 2010. Pour cause, deux particularités de l'embryon équin, à savoir, 1/ la présence d'une capsule, couche acellulaire de glycoprotéines, entre l'embryon et la zone pellucide, présente du 7^{ème} au 20^{ème} jour de gestation et gênant le passage des cryoprotecteurs et 2/une large cavité blastocoelique, entre 300 et 800 µm de diamètre à jour 7, diminuant à ce stade de développement la viabilité des embryons après cryoconservation du fait du risque de transformation du fluide blastocoelique en cristaux de glace délétères, comme pour l'embryon humain (Vanderzwalmen *et al.*, 2002). Or, c'est à partir du jour 7 post ovulation que sont collectés les embryons équins sur le terrain. Une biopsie cellulaire de l'embryon réalisée par micro-aspiration suivie d'une aspiration de plus de 70% du volume blastocoelique a permis de s'affranchir de ces problèmes (Choi *et al.*, 2011). En appliquant cette technique avant vitrification, ces auteurs ont obtenu des gestations à 30 jours (battements cardiaques décelés) à partir d'embryons de 400 à 560 µm (5/7 ; 71%). Nos propres résultats obtenus à l'INRA de Nouzilly sur ponettes Welsh B avec des embryons micro-aspirés, biopsiés, vitrifiés, décongelés et mis 3 à 4 h en culture *in vitro* avant transfert, l'ont confirmé (Reigner *et al.*, Cryo 2013). Ils ont même abouti à la naissance de 4 poulains à partir de 7 embryons transférés sur des juments à la Jumenterie du Pin, donc dans un environnement de « terrain » impliquant un transfert des embryons juste après décongélation (Guignot *et al.*, 2014 ; Guignot *et al.*, 2015a). Très récemment, d'autres auteurs ont également appliqué cette technique d'aspiration du fluide et de collapsing de l'embryon à l'aide de micromanipulateur avant vitrification (Caillaud *et al.*, 2016) et ont abouti à la naissance de nouveaux poulains (Weiss *et al.*, 2016). Cependant, la réduction de la cavité blastocoelique de l'embryon par aspiration du fluide est une technique qui nécessite l'achat d'un appareillage coûteux et un très long apprentissage pour l'opérateur, la limitant à une utilisation en laboratoire et rendant peu rapide et compliqué son transfert à la profession.

Le but de notre travail est de simplifier les différentes étapes du protocole afin d'avoir une technique de cryoconservation qui puisse être utilisable en condition de terrain et avec, d'aussi bons taux de survie que la technique actuelle. Les embryons ont été soit cryoconservés juste après collecte, soit après 24h d'attente, permettant leur acheminement jusqu'à un centre de cryoconservation. Les simplifications apportées ont été testées sur la survie *in vitro* et sur la survie *in vivo* des embryons.

1 Matériel et méthodes

1.1 Animaux

Donneuses : les embryons ont été produits à partir de ponettes Welsh B cycliques de l'UEPAO (Unité Expérimentale Physiologie Animale de l'Orfrasière) à l'INRA de Nouzilly suivant la méthode décrite par Moussa *et al* (2005) et reprise par Guignot *et al* (2015b). Brièvement, la croissance folliculaire des ponettes donneuses a été suivie par échographie et dès qu'un follicule préovulatoire atteignait un diamètre supérieur ou égal à 33 mm, l'ovulation était induite. Le lendemain de l'induction de l'ovulation, la donneuse était inséminée avec du sperme frais d'étalon fertile. Les embryons ont été collectés par les voies naturelles 7 jours après ovulation au stade blastocyste.

Receveuses : les transferts d'embryons ont été réalisés par voie cervicale sur des ponettes de l'UEPAO de moins de 8 ans et sur des juments de la Jumenterie du Pin de moins de 10 ans, à raison d'un embryon par receveuse, comme fait classiquement sur le terrain. Suivi folliculaire et induction d'ovulation ont été effectués de la même façon que pour les donneuses.



1.2 Collecte des embryons

Les embryons ont été collectés par trois irrigations de l'utérus avec 500 mL de Ringer lactate préchauffés à 37°C à l'étuve. Après filtration du milieu de collecte, les embryons ont été recherchés sous loupe binoculaire, lavés 10 fois, suivant les règles sanitaires de l'IETS, dans le milieu de conservation des embryons sur le terrain (embryo holding solution, EHM, contenant 4g/L de BSA, IMV Technologie, L'Aigle, France), qui n'a pas besoin d'être gazé. Leur diamètre a été mesuré et leur qualité morphologique évaluée selon la grille de notation allant de 1 à 4, avec 1 pour excellent et 4 pour médiocre, élaborée par McKinnon et Squires (1988).

1.3 Réfrigération des embryons

Les embryons ont été placés dans un tube 5 mL rempli de milieu EHM. Ce tube a été disposé dans un tube 50 mL rempli de Ringer lactate afin d'assurer une protection supplémentaire. Le tout a été placé dans un équitainer permettant une descente en température ménagée (passage de la température ambiante à 4° en 4 à 6h). Après 24h, le tube 5 mL avec l'embryon a été remis à température ambiante. L'embryon a été mesuré et sa qualité évaluée.

1.4 Introduction d'une micropipette dans l'embryon et réduction de la cavité blastocoelique

Les embryons ont été déposés, un par un, dans 3 gouttes successives d'un milieu sans protéine (Ringer lactate), afin qu'ils adhèrent bien au fond de la boîte de Pétri. Une pipette fine en verre, maintenue à main levée par un opérateur via un simple mandrin, a alors été introduite, sous loupe binoculaire, dans chaque embryon, à travers la capsule et la zone pellucide (si encore présente), au-dessus de l'embryon et en son centre, après avoir positionné le bouton embryonnaire à 12h. Elle a été aussitôt retirée et l'embryon incubé dans des bains de sucrose à concentration croissante, 0,1 – 0,2 – 0,4M durant 3 minutes pour chacune d'elles. La diminution de la cavité blastocoelique a été mesurée.

1.5 Vitrification des embryons

Les embryons ont été cryoconservés par vitrification ultra rapide dans des paillettes OPS (open pulled straw) très fines. Après réduction du volume de la cavité blastocoelique, les embryons ont été vitrifiés, un par un, soit avec comme milieu de base le milieu de culture mSOF (modified synthetic oviduct fluid) + 20% de sérum + 19 mM de glucose (Herrera *et al.*, 2008) qui a besoin d'être gazé, soit le milieu EHM + 20% de sérum. Les embryons ont été mis un par un dans un de ces milieux de base avec de l'éthylène glycol à 1,5 M pendant 5 minutes, puis à 7 M avec du galactose 0,6 M pendant 40 sec. Pendant ces 40 secondes, les embryons ont été montés dans une paillette fine et plongés dans l'azote liquide. Au dégel, les paillettes ont été vidées dans les mêmes milieux de base respectifs (milieu de culture ou milieu EHM + 20% de sérum) avec des concentrations décroissantes de sucrose, 0,2 puis 0,1 puis 0M.

1.6 Survie *in vitro*

Les embryons sont mis individuellement dans 500 µL de milieu mSOF avec 20% de sérum de veau foetal et 19 mM de glucose pendant 70h à 38,5°C dans un incubateur (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). A la fin de cette période, le diamètre de leur cavité blastocoelique est mesuré et comparé à celui qu'ils avaient à la collecte. Leur qualité morphologique est de nouveau évaluée selon la même grille de notation que précédemment.

1.7 Survie *in vivo*

Les embryons ont été transférés au jour 6 post ovulation de la receveuse. Pour les embryons à transférer à la Jumenterie du Pin, ceux-ci ont été transportés sur le site dans un container à azote spécial. Après réchauffement, les embryons ont été montés individuellement dans une paillette de transfert, puis la paillette dans un pistolet de transfert. Cinq jours après transfert, les receveuses ont été échographiées pour vérifier la présence d'une vésicule embryonnaire. Après 25 jours, elles ont de nouveau été échographiées afin de visualiser le développement des vésicules embryonnaires (normal, retard, absence de visualisation de l'embryon à l'échographie). La gestation a ensuite été volontairement interrompue. Concernant les transferts d'embryons témoins sur ponette, la gestation a été maintenue seulement jusqu'à 14 jours à cause de la forte utilisation des animaux de l'UEPAO durant la période de reproduction pour les différents protocoles de recherche.



2 Résultats

2.1 Résultats de survie *in vitro*

L'ensemble des résultats de survie *in vitro* se trouvent dans le tableau 1 et sont illustrés sur la figure 1.

2.1.1 Effet de l'introduction manuelle d'une pipette dans l'embryon couplée à une réduction du volume blastocœlique par différentiel de pression osmotique

Sur 10 embryons piqués à main levée juste après collecte, puis placés dans les bains de sucrose et vitrifiés avec le milieu de culture comme milieu de base, un embryon a perdu sa capsule à la décongélation et a été retiré de la suite de l'analyse. Sur les 9 embryons restants, tous étaient vivants et ont repris leur développement après culture *in vitro*, ce qui donne un taux de 100% de survie. Pour la suite de l'étude, nous avons donc retenu cette technique simplifiée d'introduction manuelle de la pipette, couplée au collapsing de l'embryon régulé par le différentiel de pression osmotique appliqué.

2.1.2 Choix du milieu de base pour la vitrification

Le milieu de base EHM, non gazé, a été testé sur des embryons vitrifiés juste après collecte (lot 0h). Sur 8 embryons piqués à main levée, déposés dans les bains de sucrose et vitrifiés avec le milieu EHM comme milieu de base, un embryon a perdu sa capsule à la décongélation et a été retiré de la suite de l'analyse. Sur les 7 embryons restants, tous étaient vivants et ont repris leur développement après culture *in vitro*, ce qui donne un taux de 100% de survie pour ce milieu, tout comme précédemment pour le milieu de culture. Au vu de ces résultats, le milieu EHM, ne nécessitant pas d'être gazé, donc d'utilisation plus facile sur le terrain, a par conséquent été retenu pour la suite de nos expériences.

2.1.3 Survie des embryons réfrigérés après cryoconservation et réchauffement

Technique simplifiée de la main levée et milieu EHM comme milieu de base pour la vitrification ont été appliqués à des embryons réfrigérés 24h après collecte. Pour les 10 embryons expérimentés, une note moyenne de $1,75 \pm 0,26$ a été obtenue après 24h de réfrigération, contre une note de $1,30 \pm 0,26$ au moment de la collecte. Cette différence est significativement différente ($P= 0,03$) : les embryons se sont dépréciés durant ce temps, ils se sont globalement contractés, ce qui a rendu l'introduction de la pipette à main levée moins aisée à réaliser que sur des embryons tout juste collectés, qui eux sont plus turgescents. Les mêmes difficultés se seraient rencontrées en utilisant le micromanipulateur. Cela ne remet donc pas en question la technique à main levée retenue. Après vitrification et décongélation, sur 10 embryons, un embryon a perdu sa capsule et a été retiré de la suite de l'analyse. Sur les 9 restants, 8 étaient vivants et ont repris leur développement après 24h de culture *in vitro*, ce qui donne un taux de survie de 89%. Ce résultat est très encourageant.

Tableau 1 : Taux de survie *in vitro* obtenus
Table 1: In vitro embryo survival rate

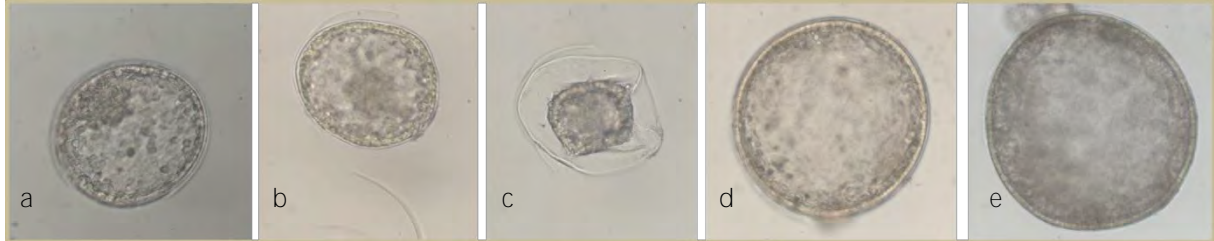
Temps entre collecte et vitrification	0h	0h	24h
Milieu de base pour la vitrification	mSOF	EHM	EHM
N embryons	10	8	10
Embryons avec capsule éclatée au dégel	1	1	1
Survie <i>in vitro</i> , n	9	7	8
Taux de survie, %	100 (9/9)	100 (7/7)	89 (8/9)

mSOF : modified synthetic oviduct fluid ; EHM : embryo holding medium

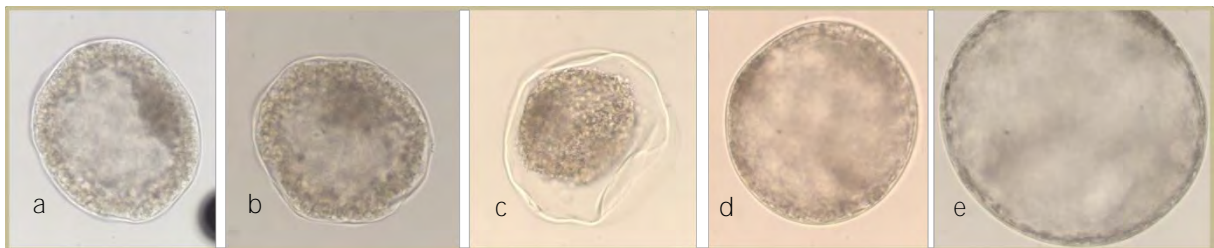


Figure I : Embryons équins après 24h de réfrigération
Figure I: Equine embryos after 24h of refrigeration

W 524 (277 μ m de diamètre, x20, grade 2 après 24h de réfrigération)



W 620 (327 μ m de diamètre, x20, grade 2 après 24h de réfrigération)



a : 24h après collecte ; b : après retrait de la pipette ; c : dans bain de sucrose 0,4 M ; d : après dégel et 44h de culture *in vitro* ; e : après 70h de culture *in vitro*.

2.2 Résultats de survie *in vivo*

Tous les embryons cryoconservés transférés ont été produits à l'UEPAO et ont été cryoconservés suivant la technique simplifiée retenue ci-dessus, à savoir, une pipette a été introduite dans l'embryon à main levée, ce dernier a ensuite été mis dans des bains de sucrose, puis vitrifié dans le milieu de base EHM.

2.2.1 Transfert sur juments

Deux séries de transfert ont été réalisées sur les juments de la Jumenterie du Pin, avec d'une part des embryons cryoconservés juste après collecte et, d'autre part des embryons cryoconservés après 24h de réfrigération. Sur les 6 embryons décongelés au total, un embryon a perdu sa capsule et n'a pas été transféré (embryon 24h). Sur les 5 embryons restants, les 2 du lot 0h ont donné une gestation à 30 jours (battements cardiaques décelés) (100%), mais les 3 du lot 24h n'ont rien donné (0%). En parallèle de ces transferts d'embryons cryoconservés, des transferts d'embryons témoins frais ont été réalisés : sur 7 transferts réalisés, 5 ont donné une gestation à 30 jours (71%).

2.2.2 Transfert sur ponettes

Au total, 12 embryons ont été décongelés à l'INRA, 7 avaient été vitrifiés juste après collecte et 5 après 24h de réfrigération. Sur les 12 embryons, aucun n'a perdu sa capsule à la décongélation et les 12 ont donc été transférés sur des ponettes de l'UEPAO. Les 7 embryons du lot 0h ont donné une gestation à 14 jours (14%), tout comme les 5 embryons du lot 24h (20%). Comme à la Jumenterie du Pin, en parallèle de ces transferts d'embryons cryoconservés, des transferts d'embryons témoins frais ont été réalisés : sur 4 transferts, 3 ont donné une gestation à 14 jours (75%).

3 Discussion

La technique simplifiée d'introduction à main levée d'une pipette, couplée à la réduction de la cavité blastocœliquique par différentiel de pression osmotique et à la vitrification dans le milieu de base utilisé classiquement sur le terrain sans avoir besoin d'être gazé que nous avons proposée dans ce travail a été validée avec succès *in vitro*, même avec des embryons réfrigérés pendant 24h. Cette technique est moins coûteuse à mettre en place sur le terrain puisqu'elle ne nécessite pas d'achat de micromanipulateurs. La présence d'un technicien expérimenté pour son utilisation reste cependant toujours obligatoire, même si le geste à réaliser est moins compliqué. Pour ce qui est de sa validation *in vivo*, même si les effectifs sont



faibles, il apparaît que la technique simplifiée de cryoconservation donne des résultats forts encourageants avec les embryons vitrifiés juste après collecte (Oh). Cette technique simplifiée pourra être incluse dans les formations de cryoconservation d'embryons équins proposées par la Jumenterie du Pin.

Le temps d'attente maximum de 24h des embryons que nous avons choisi d'appliquer permettait le transport de l'embryon du site de collecte jusqu'au centre de cryoconservation. Lorsque nous avons proposé ce temps de 24h, temps maximal appliqué sur le terrain au bout duquel les embryons sont transférés à l'état frais et ce, avec les mêmes taux de gestation (Carney *et al.*, 1991), nous nous étions dit que si les résultats de survie étaient faibles, nous pourrions envisager de diminuer un peu ce temps pour donner plus de chances aux embryons de survivre sans pour autant fortement diminuer l'intérêt de ce temps d'attente. Au vu des résultats *in vitro*, cela n'est pas nécessaire. Par contre, les résultats obtenus après transfert sur jument nous amènent à nous demander si cette durée est bien adaptée : elle est peut-être trop longue tout de même.

Le très faible taux de gestation obtenu après transfert sur ponette des embryons décongelés, gestations qui de plus ne sont pas maintenues après 14 jours, montre la difficulté de ce modèle animal à cols sinueux, difficiles à passer, comparé à la jument, sans induire de lutéolyse précoce. Pourtant, des taux de gestation plus élevés avec des embryons cryoconservés juste après collecte, et même biopsiés, donc plus fragiles normalement ont été obtenus auparavant dans notre laboratoire (Guignot *et al.*, 2015 : 3 DG30 sur 7 transferts). Dans cette expérience de 2015, avant transfert, les embryons avaient été mis deux heures en culture *in vitro* juste après décongélation, au lieu d'être de suite transférés comme dans les expériences décrites ici. Comme le meilleur milieu pour reprendre un développement embryonnaire est le milieu utérin, si la femelle est au bon stade physiologique bien sûr, et que tous les embryons décongelés en 2015 avaient repris leur développement *in vitro* et avaient tous été transférés, nous ne nous expliquons pas bien pourquoi nous avons eu de si faibles résultats de gestation après transfert sur ponette cette fois-ci. D'autre part, les transferts d'embryons frais sur ponette ont donné de bons résultats, comparables à ceux obtenus suite aux transferts d'embryons frais sur jument : les embryons cryoconservés sont peut-être plus sensibles au stress généré lors du passage du col des ponettes.

Lors de la décongélation, des embryons ont parfois perdu leur capsule qui s'est rompue en deux. Ces embryons ont dû être retirés de l'analyse car ils n'ont aucune possibilité de reformer leur capsule une fois arrivés au stade blastocyste et donc aucune chance de donner une gestation s'ils sont transférés dans une receveuse. Cette fragilité de la capsule lors du réchauffement doit être induite par le trou laissé par la pipette dans cette dernière quand la pipette est introduite dans l'embryon juste avant réduction du volume blastocoelique. Des tensions doivent s'opérer sur la capsule, jusqu'au point de la rompre. Nous supposons qu'en fonction de ces forces, leur intensité, la position relative de l'embryon dans la paillette OPS et du trou laissé dans la capsule, l'éclatement de cette dernière se produit ou non lors de la décongélation. Il faudrait pouvoir diminuer voire éliminer totalement ce problème qui fait perdre des embryons, ce qui a un coût. Pour l'heure, nous ne voyons pas comment nous pourrions éviter ce phénomène, si tant est qu'il puisse l'être.

Remerciements

A l'ensemble du personnel de la jumenterie de l'UEPAO de Nouzilly et de la Jumenterie du Pin.

A l'IFCE qui a financé une grande partie de ces expériences.

Références

- Caillaud, M., Provost, E., Guignot, F. 2016. Cooling equine embryo for 24h prior to vitrification : What are the consequences on its viability ? J Equine Vet Science, 41, 56.
- Carney, N.J., Squires, E.L., Cook, V.M., Seidel, G.E., Jasko, D.L., 1991. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. Theriogenology 36, 23-32.
- Choi, Y.H., Velez, I.C., Riera, F.L., Roldán, J.E., Hartman, D.L., Bliss, S.B., Blanchard, T.L., Hayden, S.S., Hinrichs, K., 2011. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. Theriogenology 76, 143-152.
- Guignot, F., Reigner, F., Blard, T., Orbinot, J., Barrière, P., Yvon J.M., Mermillod, P., Caillaud, M. 2014. First birth after transfer of sexed and cryopreserved Welsh pony blastocysts in France. 30th AETE Dresden, Deutschland, abstract p:110.
- Guignot, F., Reigner, F., Duchamp, G., Blard, T., Barrière, P., Yvon, J.M., Allamelou, J.M., Danvy, S., Mermillod, P., Caillaud, M. 2015a. Premières naissances en France après transfert d'embryons équins génotypés et cryoconservés. 41^{ème} Journée de la Recherche Equine, 12 mars 2015, 78-83.



- Guignot, F., Reigner, F., Perreau, C., Tartarin, P., Babilliot, J.M., Bed'hom, B., Vidament, M., Mermillod, P., Duchamp, G. 2015b. Preimplantation genetic diagnosis in Welsh pony embryos after biopsy and cryopreservation. *Journal of American Science*, 93: 5222–5231, doi:10.2527/jas2015-9469
- Herrera, C., Revora, M., Vivani, L., Miragaya, M.H., Losinno, L., Quintans, C., Pasqualini, R.S. 2008. Effect of high glucose concentrations during in vitro culture of equine embryos. 7th Int Symp on Equine Embryon Transfer, Suffolk, UK 52-53.
- McKinnon, A.O., Squires, E.L., 1988. Morphological assessment of the equine embryo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 401-406.
- Moussa, M., Bersinger, I., Doligez, P., Guignot, F., Duchamp, G., Vidament, M., Mermillod, M., Bruyas, J.F. 2005. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 64, 1619-1632.
- Reigner, F., Perreau C., Blard, Barrière, P., Gascogne T., Yvon, J.M., Gaude, Y., Mermillod, P., Duchamp, G., Guignot, F. 2013. First pregnancy after transfer of biopsied and vitrified embryos in Welsh pony mare. 3ème Congrès CRYO, Berlin, A-3.
- Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C., Standaert, V., van Roosendaal, E., Vandervorst, M., Bollen, N., Zech, H., Mukaida, T., Takahashi, K., Schoysman, R., 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human reproduction* 17, 744-751.
- Weiss, J., Blanco, M., Sanchez, R., Arbouin, C., Schockemöhle, P. 2016. Comparison between an open and a closed vitrification system for equine forced-collapsed embryos. *J Equine Vet Science*, 41, 52-53.