

La vitrification de l'embryon équin avec une technique simplifiée

Texte proposé par :
Florence GUIGNOT - Inra

(VERSION ORIGINALE)

EASY TECHNIQUE TO CRYOPRESERVE WELSH PONY EMBRYO

Authors and co-authors:

Florence GUIGNOT (1), Thierry BLARD (2), Philippe BARRIÈRE (2), Thierry GASCOGNE (2), Yvan GAUDE (2), Jean-Marie YVON (2), Pascal MERMILLOD (1), Fabrice REIGNER (2)

(1) UMR INRA-CNRS-Université de Tours-IFCE, PRC, 37380, Nouzilly, France

(2) UEPAO INRA, UE1297, 37380, Nouzilly, France

Contact: florence.guignot@inra.fr

Embryo cryopreservation and transfer is a powerful tool for genetic selection and has extensive economical and clinical applications. In equine embryos, cryopreservation of early embryos <300 µm in diameter leads to high pregnancy rates (70%-80%). Nevertheless, equine embryo cryopreservation was problematic at capsule stage, particularly with embryos >300 µm in diameter. At embryo collection, generally D7 after ovulation in field conditions, large blastocysts with capsules were often obtained. Blastocoel fluid suction could circumvent this difficulty and allow the cryopreservation of large equine embryos [1]. We have already validated this technique on pony embryos [2] and obtained the first four births in France after transfer of genotyped and vitrified embryos [3]. However, this technique required high skilfulness and expansive equipment.

The aim of this study was to try an easier technique to reduce blastocoelic fluid volume and to maintain the same survival rate after cryopreservation and warming of Welsh pony embryos.

Twenty eight expanded blastocysts, 166 - 777 µm in diameter (mean of the diameter ± SEM = 370 ± 30 µm), were collected at D7 after ovulation. After collection, 18 embryos were cryopreserved immediately (group 0h) while 10 embryos were refrigerated in an Equitainer at 4°C during 24h prior cryopreservation (group 24h). Just before embryo vitrification, a glass pipette was positioned above the embryos under a stereomicroscope, introduced into the blastocoele cavity and quickly retrieved. Then, embryos were deposited in medium with increasing sucrose concentration (0.1-0.2-0.4M) for 3 min each. Embryos collapsed and were immediately vitrified using the OPS procedure. Briefly, embryos were vitrified in 2 steps: 1.5M ethylene glycol (EG) for 5 min and 7M EG supplemented with 0.6M galactose for 30 sec. One embryo was then loaded per straw. Two base media were tested for collapsing and vitrification in group 0h: culture medium (CM: modified synthetic fluid + 20% foetal calf serum + 19mM glucose) (N=10) and embryo holding medium (EHM: PBS + 4g/L BSA) (N=8). In group 24h, only EHM was tested. At thawing, all embryos were deposited in EHM with decreasing sucrose concentration (0.2-0.1-0.0M) for 3 min each and placed in CM for 24h in a humidified atmosphere of 5%CO₂, 5%O₂ and 90%N₂ at 38.5°C and embryo survival rate was noted. At thawing, one embryo lost his capsule in both group and media and was discarded. After 24h of in vitro culture, 9/9 (100%) 7/7 (100%) and 8/9 (89%) embryos have survived for group 0h-CM, 0h-EHM and 24h-EHM respectively.

This technique is really easy, quick to perform and very cheap. Moreover the results are very exciting, particularly with the 24h refrigerated embryos.

A grant from IFCE was received to perform this experiment.

[1] Choi YH et al. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology* 2011;76:143–152.

[2] Guignot F et al. Preimplantation genetic diagnosis in Welsh pony embryos after biopsy and cryopreservation. *J Anim Sci* 2015;93:5222–5231.

[3] Guignot F et al. Premières naissances en France après transfert d'embryons équins génotypés et cryoconservés. *41ème J Rech Equine* 2015;78-83.

(VERSION TRADUITE PAR LAETITIA MARNAY, RELUE PAR MAUD CAILLAUD)

Technique simplifiée de cryoconservation d'embryons de poneys welsh

Auteurs et co-auteurs:

Florence GUIGNOT (1), Thierry BLARD (2), Philippe BARRIÈRE (2), Thierry GASCOGNE (2), Yvan GAUDE (2), Jean-Marie YVON (2), Pascal MERMILLOD (1), Fabrice REIGNER (2)

(1) UMR INRA-CNRS-Université de Tours-IFCE, PRC, 37380, Nouzilly, France

(2) UEPAO INRA, UE1297, 37380, Nouzilly, France

Contact: florence.guignot@inra.fr

La cryoconservation et le transfert d'embryons sont un puissant outil de diffusion génétique et ont de nombreuses applications économiques et cliniques. Pour l'espèce équine, la cryoconservation de jeunes embryons d'un diamètre <300 µm conduit à des taux de gestation élevés (70-80%). Toutefois, avant 2010, la cryoconservation des embryons équins était problématique après l'apparition de la capsule, particulièrement avec des embryons de plus de 300µm de diamètre. Lors de la collecte de l'embryon, en général à J-7 post-ovulation dans les conditions de terrain, de gros blastocystes entourés de leur capsule étaient la plupart du temps obtenus. L'aspiration du liquide blastocoelique permettait de contourner cette difficulté et de cryoconserver ces gros embryons [1]. Nous avons déjà validé cette technique sur des embryons de poneys [2] et obtenu les quatre premières naissances en France après transfert d'embryons génotypés et vitrifiés [3]. Cependant, cette technique nécessite une haute technicité du manipulateur et un matériel onéreux.

L'objectif de cette étude était de tester une technique moins coûteuse et plus simple de réduction du volume de liquide blastocoelique tout en conservant le même taux de survie après congélation- décongélation d'embryons de poneys Welsh.

Vingt-huit blastocystes d'un diamètre de 166-777µm (diamètre moyen ± SEM = 370 ± 30 µm) ont été collectés 7 jours après ovulation. A l'issue de la collecte, 18 embryons ont été congelés immédiatement (groupe Oh), les 10 autres réfrigérés dans un Equitainer à 4°C pendant 24h avant congélation (groupe 24h). Juste avant la vitrification, une fine pipette en verre a été placée, à main levée, au dessus de chaque embryon sous une loupe binoculaire, introduite dans la cavité blastocoelique avant d'être aussitôt retirée. Ensuite, l'embryon a été incubé dans des bains de sucrose à concentration croissante (0,1-0,2-0,4M), pendant trois minutes pour chacun d'eux. Les embryons collapsés ont été immédiatement vitrifiés en utilisant la technique OPS. La vitrification a été réalisée en deux étapes : éthylène glycol (EG) à 1,5M pendant 5 min puis et EG à 7M + galactose 0,6M pendant 30 secondes. Chaque embryon était alors monté dans une paillette. Deux milieux de base ont été testés pour l'aspiration du liquide blastocoelique et la vitrification dans le groupe Oh : Le milieu de culture (CM : modified synthetic fluid + 20% sérum de veau foetal + 19mM glucose) (N=10) et le milieu de conservation des embryons (embryo holding medium (EHM) : PBS + 4g/L BSA). Dans le groupe 24h, seul le milieu de conservation EHM a été testé. Lors de leur décongélation, tous les embryons ont été placés dans le milieu EHM avec une concentration de sucrose décroissante (0,2-0,1-0,0M), 3 minutes dans chaque bain et incubés 24h dans du CM en atmosphère humide à 5% CO₂, 5% O₂ et 90% N₂ à 38.5°C et le taux de survie des embryons a été relevé. A la décongélation un embryon a perdu sa capsule dans chacun des deux groupes et milieux et a été écarté du protocole. Après 24h de culture in vitro, 9/9 (100%) 7/7 (100%) et 8/9 (89%) des embryons ont survécu pour les groupes : Oh-CM, Oh-EHM et 24h-EHM respectivement.

Cette technique est vraiment simple, rapide à réaliser et peu onéreuse. De plus, les résultats sont réellement prometteurs, en particulier pour les embryons réfrigérés 24h.

Cette expérimentation a bénéficié du soutien financier de l'Ifce.