

# Cryoconservation d'embryons porcins âgés de 5 à 6 jours en utilisant une méthode de refroidissement ultra-rapide : la méthode Open Pulled Straw (OPS)

Françoise BERTHELOT, Françoise MARTINAT - BOTTÉ, A. LOCATELLI, M. TERQUI

Institut National de la Recherche Agronomique  
Unité de Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques - 37380 Nouzilly

## Cryoconservation d'embryons porcins âgés de 5 à 6 jours en utilisant une méthode de refroidissement ultra-rapide : la méthode Open Pulled Straw (OPS)

L'objectif de notre étude a été de confirmer l'intérêt de la vitrification ultra-rapide chez le porc.

Les embryons de 2 génotypes, aux stades morula et blastocyste sont répartis en lots : témoin ou vitrification. Les témoins sont maintenus in vitro pendant 2 à 5 jours jusqu'à leur sortie éventuelle de pellucide. Les autres, par groupes de 2 à 5 sont passés dans 4 bains de vitrification successifs MB (tampon phosphate + 20 % de serum de veau) + diméthylsulphoxide + éthylène glycol + sucrose, puis rassemblés dans une gouttelette de 2 $\mu$ l et aspirés par capillarité dans la paille OPS. Puis ils sont plongés dans l'azote liquide jusqu'à leur réchauffement par passage dans 4 bains de MB + sucrose. La capacité de ces embryons à se développer a été évaluée soit par leur aptitude à sortir de pellucide in vitro soit par transfert dans des receveuses MS.

Les résultats obtenus avec les embryons témoins ne diffèrent pas entre stades et génotypes. Par contre, le stade de l'embryon au moment de la vitrification est déterminant. Le taux de sortie des morulae est plus faible que celui des blastocystes (MS : 14 % vs 67 % ; LWh : 11 % vs 27 % ;  $p \leq 0,05$ ). Au stade blastocyste, une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) est observée entre MS et LWh : 67 % vs 27 %. 11 transferts de blastocystes LWh ou MS ont été réalisés, le taux de gestation est de 55 %. A ce jour, une receveuse portant des blastocystes MS, l'autre des LWh ont mis bas respectivement de 4 et 5 porcelets. Pour le stade morula, le rendement doit être amélioré avant d'envisager des transferts.

La méthode OPS permet de cryoconserver les blastocystes MS et LWh.

## Vitrification of pig embryos aged between 5 to 6 days using an ultra-rapid freezing method: Open Pulled Straw (OPS) method

An ultra-rapid cooling method (OPS) was tested for its ability to preserve embryos from chilling damage.

Embryos were recovered 5 to 6 days after the 1st insemination of LWh and MS gilts. Morulas and unhatched blastocysts were allocated to either a control or a vitrification group. Controls were maintained in culture for 2 to 5 days. Embryos were frozen, after a 4 step equilibration process in Basal Medium (PBS + 20 % of calf serum) + ethylene glycol + dimethylsulfoxide + sucrose. Two to five embryos were transferred in a 2 $\mu$ l droplet, loaded into the end of the straw (OPS) by capillary action and then plunged into liquid nitrogen. Subsequently, the straws were warmed by immersion in BM + sucrose. The ability of embryos to develop was evaluated either, by in vitro culture for 1 to 5 days to record the number of hatched blastocysts or by surgical transfer to MS gilts.

The results of in vitro survival obtained with controls did not differ between the different stages of development and were not affected by genotype.

After vitrification, LWh blastocysts had a lower survival rate than MS blastocysts (27 % vs. 67%,  $p \leq 0.05$ ). This result was similar to MS control (72%). The survival of vitrified blastocysts was higher than for morulas ( $p \leq 0.05$ ). For the morula stage, the hatching rate was low and there was no significant difference between LWh (11%) and MS (14%). Eleven surgical transfers of LWh or MS vitrified blastocysts were performed in MS recipients and six became pregnant. Two of them farrowed respectively 4 MS and 5 LWh live piglets. The method described must be improved before transfer of morula can be performed.

The OPS method allows cryo-preservation of MS and LWh blastocysts.

## INTRODUCTION

En France, l'érosion de la diversité génétique de nos animaux d'élevage nécessite la création d'une cryobanque de gamètes et d'embryons pour une gestion et une utilisation à long terme des ressources génétiques. Chez les porcins, elle permettrait, en particulier, la sauvegarde des races locales en situation critique. Une banque de semence est en cours de réalisation (LABROUE et LUQUET, 1999), mais la reconstitution d'une race en danger ou d'une lignée génétique spécifique serait grandement facilitée si on disposait d'embryons ou d'ovocytes cryoconservés.

Chez les porcins, il n'existe pas de technique répétable de cryoconservation des embryons. Une dizaine de porcelets seulement sont nés de part le monde après le transfert d'embryons congelés / décongelés (HAYASHI et al., 1989; FUJINO et al., 1993; KAMEYAMA et al., 1990). La présence de lipides a souvent été évoquée comme un obstacle à la congélation de l'embryon porc. NAGASHIMA et al., (1995) ont délipidé de jeunes embryons (2 à 4 cellules) et 3 porcelets sont nés après transfert de 181 embryons congelés / décongelés. Aucune des méthodes proposées, souvent difficiles à mettre en œuvre, n'ont donné de résultats satisfaisants. La congélation lente ne semble donc pas offrir de solution fiable pour conserver l'embryon de porc.

La vitrification est une méthode actuellement testée dans la plupart des espèces (DOBRINSKY, 1997; DONNAY et al., 1998). C'est une méthode simple à mettre en œuvre. Les embryons sont placés dans un milieu contenant des concentrations élevées de cryoprotecteurs ("antigel") qui les protège de la formation de cristaux de glace, et plongés directement dans l'azote liquide. Cette descente rapide de température (3000°C / minute) leur permet de passer certaines températures critiques en limitant les dommages (MAZUR, 1990). Chez le porc, cette technique a donné, à ce jour, une vingtaine de porcelets après transfert de 280 blastocystes vitrifiés / réchauffés (DOBRINSKY et al., 1998; KOBAYASHI et al., 1998).

STEPONKUS et al., (1990) ont proposé, chez la drosophile, une technique utilisant un abaissement ultra-rapide de la température (24000°C/mn) qui permet de passer très rapidement les seuils critiques. Cette vitesse de descente s'obtient en réduisant les volumes à quelques microlitres. Ce principe a été repris par une équipe Danoise pour l'embryon bovin et porc (VAJTA et al., 1997 a; VAJTA et al., 1997 b). Chez le porc, avec cette méthode appelée **OPS (Open Pulled Straw)**, VAJTA et al. (1997 b) obtiennent en culture après réchauffement, 73 % de blastocystes sortant de pellucide. La vitesse de refroidissement apparaît être une des clefs pour préserver l'embryon de porc des dommages causés par l'abaissement de température.

L'objectif de notre étude a été de confirmer l'intérêt de la vitrification ultra-rapide, en utilisant des embryons de deux génotypes (Large White hyperprolifique: LWh et Meishan : MS) afin de s'assurer que la méthode développée n'est pas spécifique d'un génotype donné. Après vitrification et

réchauffement de ces embryons, leur viabilité a été établie soit après développement in vitro soit après transfert dans des receveuses.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux

Cette étude a été réalisée à l'élevage expérimental de l'INRA de Nouzilly (37380). Les donneuses d'embryons sont des cochettes cycliques âgées de 5 à 8 mois au moment de leur introduction dans l'expérience. Elles sont soit de génotype Meishan (MS, n=27) soit Large White hyperprolifique (LWh, n=35). Les receveuses sont des MS (n=11) de même âge.

### 1.2. Production et récolte d'embryons

#### 1.2.1. Production d'embryons

Les donneuses d'embryons sont inséminées soit sur oestrus induit après un traitement progestatif Régumate, (20mg / j / femelle pendant 18 jours, Hoechst Roussel Vet, Pantin, France) soit sur chaleur spontanée. La détection des oestrus est faite deux fois par jour à l'aide d'un verrat.

La collecte et la préparation des doses de semence sont réalisées par la SEIA – INRA, Rouillé (86480). Les truies donneuses sont inséminées deux fois ( $6.10^9$  spermatozoïdes / donneuse) avec de la semence de verrat de génotype différent (Piétrain essentiellement) afin de bénéficier de la vigueur hybride (MARTINAT-BOTTÉ et al., 1992 a).

Pour clarifier le texte, il sera indiqué uniquement le génotype de la mère lorsque l'on fera mention du génotype de l'embryon bien que ce dernier soit croisé.

#### 1.2.2. Récolte d'embryons

Les donneuses sont abattues 5 à 6 jours après la 1<sup>ère</sup> insémination. L'appareil génital des cochettes donneuses est prélevé dans les minutes qui suivent leur abattage. Les embryons sont récoltés après perfusion des deux cornes utérines avec du tampon phosphate à 37°C additionné de 2 % de sérum de veau. Le stade de développement des embryons est apprécié à la loupe binoculaire (grossissement x 20). Seuls les embryons aux stades morulae et blastocystes (photo 1) sont sélectionnés pour cette étude, ils sont transférés dans le milieu de culture U sans polyvinyl pyrrolidone (BERTHELOT et TERQUI, 1996) et maintenus à 39°C jusqu'à leur mise en lot.

### 1.3. Schéma expérimental

Les morulae et les blastocystes sont répartis respectivement en deux lots : témoin ou vitrification.

La capacité de ces embryons à se développer sera évaluée de deux manières : soit par leur aptitude à sortir de pellucide in vitro soit à se développer in vivo après transfert.

Les embryons témoins ne subissent aucun traitement, ils sont maintenus en culture jusqu'à leur éventuelle sortie de pellucide (2 à 5 jours).

Les embryons vitrifiés sont stockés dans l'azote liquide jusqu'à leur réchauffement qui sera suivi soit de leur transfert soit de leur mise en culture pendant 2 à 5 jours.

#### 1.4. Vitrification / Réchauffement

Le milieu de base (MB) est un tampon phosphate équilibré à 290 mOsm. pour compenser la dilution saline due aux fortes concentrations de cryoprotecteurs et supplémentés avec 20 % de sérum de veau.

##### 1.4.1. Vitrification selon la méthode **OPS**

L'**O**pen **P**ulled **S**taw est une paille fabriquée par la société DEMTEK (Aarhus, Danemark) dont une des extrémités est suffisamment fine pour permettre la montée par capillarité des embryons baignant dans un microvolume de solution de vitrification (2µl), et dont la paroi est assez mince pour permettre un refroidissement rapide.

Les morulae et les blastocystes sont vitrifiés séparément. Les embryons sont vitrifiés par groupes de 2 à 5 et transportés du bain 1 au bain 4 comme l'indique le tableau 1.

Dans le 4<sup>ème</sup> bain, les embryons sont rassemblés dans 20µl puis aspirés dans 2µl du milieu de vitrification à l'aide d'une pipette et déposés doucement sur le fond d'une boîte de culture.

Dès que le bout étroit de la paille **OPS** touche la gouttelette, celle-ci est aussitôt aspirée par capillarité.

La paille contenant le groupe d'embryons dans sa microgoutte de solution de vitrification est plongée immédiatement dans l'azote liquide où les embryons sont conservés jusqu'à leur réchauffement pour une utilisation ultérieure : développement *in vitro* ou transfert dans une receveuse.

##### 1.4.2. Réchauffement

La paille contenant les embryons est sortie de l'azote liquide et après 5 secondes dans l'air, elle est immergée verticalement dans le 1<sup>er</sup> bain de réchauffement (tableau 2). Les embryons tombent par gravité au fond du bain puis sont successivement passés dans les autres bains dont la durée est indiquée dans le tableau 2. Ils sont alors transférés dans le milieu de culture U (BERTHELOT et TERQUI, 1996) additionné de 20 % de sérum.

#### 1.5. Développement *in vitro*

Les embryons témoins et une partie des embryons vitrifiés / réchauffés sont mis en culture à 39°C sous atmosphère contenant 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 90 % N<sub>2</sub> pendant 2 à 5 jours dans 100 µl de milieu U sans polyvinyl pyrrolidone mais

**Tableau 1** - Composition et durée des 4 bains successifs de 1ml de milieux de vitrification.

	1	2	3	4
<b>Milieu</b>	MB	MB	MB : 85 % EG : 7,5 % DMSO : 7,5 %	MB : 64 % EG : 18 % DMSO : 18 %
<b>Temps</b>	1 min.	1 min.	3 min. [2 M]	1 min. [6,5 M]

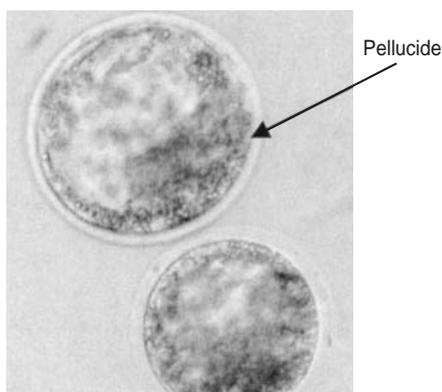
MB : Milieu de base ; EG : Éthylène Glycol ; DMSO : Diméthylsulfoxyde ; [xM] : Molarité cumulée des 2 cryoprotecteurs

**Tableau 2** - Composition et durée des 4 bains successifs de 1ml de milieux de réchauffement.

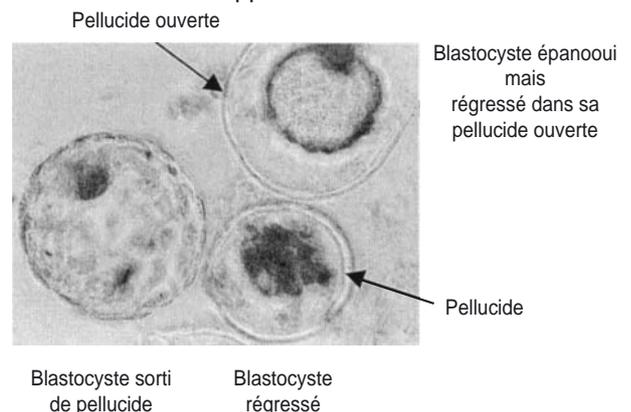
	1	2	3	4
<b>Milieu</b>	MB + Sucrose 0,2 M	MB + Sucrose 0,2 M	MB + Sucrose 0,1 M	MB
<b>Temps</b>	1 min.	5 min.	5 min.	5 min.

MB : Milieu de base

**Photo 1** - Blastocystes : avant vitrification



**Photo 2** - Blastocystes : après vitrification réchauffement et développement *in vitro*



additionné de 20 % de sérum (BERTHELOT et TERQUI, 1996).

La survie des embryons témoins et vitrifiés est évaluée par leur capacité à sortir de pellucide (photos 1 et 2).

## 1.6. Transfert

Tous les transferts sont effectués sur des truies de génotype MS car il a été montré que le taux de gestation et la survie embryonnaire sont meilleurs avec ce génotype (MARTINAT-BOTTÉ et al., 1992 b).

Aucune receveuse n'a été inséminée. Leurs oestrus sont synchrones de celles des donneuses.

Le transfert est réalisé par voie chirurgicale d'après la technique décrite par MARTINAT-BOTTE et al. (1992 a). Aucun transfert, ni de morulae ni de témoins n'a été réalisé à ce jour. Une à deux heures après le réchauffement, 20 blastocystes rassemblés dans le milieu de culture sont introduits à l'aide d'une seringue dans un cathéter stérile et souple et déposés dans le haut d'une corne utérine.

En l'absence de retour en oestrus des receveuses, une échographie est réalisée vers 30 jours de gestation.

## 1.7. Collecte des données et analyse statistique

Pour chaque donneuse, trois paramètres ont été enregistrés : le nombre de morulae et / ou de blastocystes mis par lots, le nombre d'embryons encore présents après vitrification et le nombre de blastocystes sortis de pellucide après culture in vitro. Les pourcentages de sorties de pellucide ont ainsi pu être calculés. Le taux de sortie de pellucide entre groupes et génotypes a été analysé selon la procédure CATMOD du logiciel SAS (1997).

## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le nombre moyen d'ovulations est significativement ( $p \leq 0,01$ ) augmenté chez les cochettes LWh ( $17,4 \pm 0,7$  ;  $m \pm se$ ) par rapport aux MS ( $14,5 \pm 0,7$ ). Cette supériorité ovulatoire des cochettes LWh a d'ailleurs été décrite par DRIANCOURT et al., (1998). Les femelles MS ont un taux d'ovulation moyen qui est peu différent de celui cité par TERQUI et al. (1992). Le nombre moyen d'embryons diffère entre génotype :  $12,9 \pm 0,8$  chez les LWh et  $10,4 \pm 0,8$  chez les MS ( $p \leq 0,01$ ). Le taux de collecte est en moyenne de 74 % ce qui est identique aux résultats publiés par MARTINAT-BOTTÉ et al. (1992 a).

La répartition des embryons dans les différents lots est explicitée dans le tableau 3.

## 2.1. Résultats après développement in vitro

Après culture de 2 à 5 jours, on observe des embryons à différents stades de développement. Comme l'illustre la photo 2 (p.435), un embryon est sorti de pellucide, un autre est régressé, le dernier s'est épanoui mais est resté à l'intérieur de sa pellucide ouverte. Seuls les embryons complètement sortis de leur pellucide sont pris en compte dans le calcul du taux de sortie de pellucide exprimé en pourcentage. Ce critère est beaucoup plus restrictif que celui utilisé par VAJTA et al. (1997 b) qui décomptent aussi les blastocystes incomplètement sortis de pellucide. En effet, nous avons remarqué qu'un certain nombre d'embryons amorçaient une croissance normale, une sortie, puis s'arrêtaient et régressaient.

Pour le lot témoin, environ 70 % des embryons (morulae ou blastocystes) mis en culture sortent complètement de pellucide. Ce taux ne diffère pas entre le stade et le génotype.

Par contre, le stade de l'embryon au moment de la vitrification est crucial car dans tous les cas, le taux de sortie de pellucide des morulae est plus faible que celui des blastocystes ( $p \leq 0,05$ ; tableau 4). Ce résultat est conforme à celui obtenu par d'autres auteurs qui montrent que la cryoconservation n'est encore réalisable chez le porc qu'au stade blastocyste (DOBRINSKY, 1996; DOBRINSKY, 1997; NAGASHIMA et al., 1994).

Pour le stade morula, le faible taux de sortie ne diffère pas entre les deux génotypes (LWh : 11 % vs MS : 14%). Par contre, pour le stade blastocyste, une différence est observée entre race. En effet, le taux de sortie des blastocystes LWh est significativement plus faible ( $p \leq 0,05$ ) que celui des MS : 27 % vs 67 %. Par contre, il ne diffère pas de celui des blastocystes témoins: 67 % vs 72 % (tableau 4).

Actuellement, VAJTA et al. (1997 b) ont publié des résultats avec la méthode OPS, ils ont obtenu 11 blastocystes sortant de pellucide sur les 15 vitrifiés / réchauffés (73 %). Ces données sont obtenues dans des conditions différentes des nôtres: embryons Landrace et milieux de vitrification différents. Mais si on ajoute à nos résultats les blastocystes sortant de pellucide après vitrification / réchauffement, le pourcentage est alors de 73 % pour les blastocystes MS, et de 53 % pour les LWh ( $p \leq 0,05$ ). Pour les embryons MS, ces chiffres ne sont pas différents de ceux de VAJTA et al. (1997 b) obtenus avec des blastocystes Landrace.

## 2.2. Résultats après transfert

Le taux de gestation est actuellement de 55 % pour les 11 transferts réalisés.

**Tableau 3** - Nombre d'embryons utilisés dans les différents lots

Lots	Morulae	Blastocystes	Morulae + Blastocystes
<b>Vitrification + culture</b>	118	93	211
<b>Transferts</b>	0	220	220
<b>Témoins</b>	28	51	79
<b>Total</b>	146	364	510

**Tableau 4** - Taux de blastocystes et de morulae sortis de pellucide après 2 à 5 jours de culture en fonction du génotype LWh ou MS

Génotypes	LWh		MS	
	Vitrification	Témoin	Vitrification	Témoin
Blastocystes	27% (45) a	70% (40) b	67% (48) b	72% (11) b
Morulae	11% (61) c	64% (17) b	14% (57) c	72% (11) b

LWh : Large White hyperprolifère ; MS : Meishan; ( ) : Nombre total d'embryons; a b c  $p \leq 0,05$

**Tableau 5** - Résultats obtenus après transferts (20 blastocystes vitrifiés/réchauffés par receveuse)

Génotypes	Nombre de truies receveuses	Nombre de truies gravides	Nombre de mises bas	Nombre de porcelets vivants et normaux	Nombre de truies revenues en oestrus
LWh	6	1	1	5	4
MS	5	3	1	4	1
Total	11	4	2	9	5

LWh : Large White hyperprolifère ; MS : Meishan;

Il a été fait 6 transferts avec des blastocystes LWh; une receveuse a mis bas de 5 porcelets, et une autre est confirmée gravide. En ce qui concerne les blastocystes MS vitrifiés / réchauffés, sur les 5 transferts effectués, une receveuse a mis bas de 4 porcelets et 3 autres sont confirmées gravides par échographie. Toutes les receveuses vides sont revenues en oestrus dans des délais normaux (19 jours), sauf une à 29 jours (tableau 5).

## CONCLUSIONS

Comme cela a déjà été montré avec d'autres méthodes, les morulae sont plus difficiles à vitrifier que les blastocystes, une étude sera nécessaire pour comprendre les causes d'échec

et améliorer le rendement.

Ce travail démontre que la méthode **OPS** est utilisable et reproductible pour vitrifier les blastocystes porcins et donner naissance à des porcelets normaux.

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. E. VENTURI et son équipe de l'élevage porcine, le personnel de l'hôpital - abattoir (PRMD - INRA, 37380 Nouzilly) pour leur collaboration efficace lors de la réalisation de ce travail, ainsi que Mme Odile MOULIN pour la préparation des documents photographiques. Nos remerciements vont aussi à M. P. MERMILLOD pour ses précieux conseils et suggestions.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTHELOT F., TERQUI M., 1996. *Reprod. Nutr. Dev.*, 36, 241-251.
- DOBRINSKY J.R., 1996. *Theriogenology*, 45, 17-26.
- DOBRINSKY J.R., 1997. *J. Reprod. Fert.*, 52, 301-312.
- DOBRINSKY J.R., PURSEL V.G., LONG C.R., JOHNSON L. A., 1998. *Theriogenology*, 49, 166.
- DONNAY I., AUQUIER P., KAIDI S. et al, 1998. *Anim Reprod Sci*, 52, 93-104.
- DRIANCOURT M.A., MARTINAT-BOTTÉ F., TERQUI M., 1998. *INRA Prod. Anim.*, 11 (3), 211-256.
- FUJINO Y., UJISATO Y., ENDO K. et al, 1993. *Cryobiology*, 30, 299-305.
- HAYASHI S., KOBAYASHI K., MIZUNO J., SAITOH K., HIRANO S., 1989. *Veterinary Record*, 125, 43-44.
- KAMEYAMA K., TAKEDOMI T., ITAKURA H., ONIHARA T., 1990. *Proceedings of 78th Annual Conference of the Japanese Society of Animal Reproduction*. Niigata, Japan, 22 abst.
- KOBAYASHI S., TAKEI M., KANO M., TOMITA M., LEIBO S. P., 1998. *Cryobiology*, 36, 20-31.
- LABROUE F., LUQUET M., 1999. *Techni Porc*, 22 (1), 17-19.
- MARTINAT-BOTTÉ F., PLAT M., PROCUREUR R., DESPRÉS P., LOCATELLI A., 1992 a. *Journées Rech. Porcine en France*, 24, 315-320.
- MARTINAT-BOTTÉ F., PLAT M., PROCUREUR R., TERQUI M., 1992 b. *International Symposium on Chinese pig Breeds*, 11-14 août 1992, Harbin, China, p: 561-564.
- MAZUR P., 1990. *Cell Biophys.*, 17, 53-92.
- NAGASHIMA H., KASHIWAZAKI N., ASHMAN R.J. et al, 1994. *Theriogenology*, 41, 113-118.
- NAGASHIMA H., KASHIWAZAKI N., ASHMAN R.J., GRUPEN C.J., NOTTLE M.B., 1995. *Nature*, 374, 416.
- SAS Institute Inc., SAS/STAT<sup>®</sup>, 1997. *Guide for personal computers*, Version 6.12, CARY NC, SAS Institute Inc.
- STEPONKUS P.L., MYERS S.P., LYNCH D.V. et al, 1990. *Nature*, 345, 170-172.
- TERQUI M., BAZER F.W., MARTINAT-BOTTÉ F., 1992. *Journées Rech. Porcine en France*, 24, 351-356.
- VAJTA G., BOOTH P.J., HOLM P., GREVE T., CALLESEN H., 1997 a. *Cryo-Letters*, 18, 191-195.
- VAJTA G., HOLM P., GREVE T., CALLESEN H., 1997 b. *Acta Vet. Scand.*, 38, 349-352.