Thèse N° : 145 - 2012 Année : 2012

# THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES – SANTE

Pour l'obtention du

## DIPLÔME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 1er octobre 2012

par

**Pierre BRUYERE**

# Evaluation thermodynamique et biologique d'un substituant synthétique aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères

**Membres du jury**

M. le Professeur Jean-François GUERIN, Président
Mme le Professeur Nicole HAGEN-PICARD, Rapporteur
M. le Professeur Francis FIENI, Rapporteur
M. le Docteur Thierry JOLY, Examinateur
M. le Professeur Gérard LOUIS, Examinateur
Mme le Docteur Anne BAUDOT, Co-encadrante de Thèse
M. le Docteur Samuel BUFF, Co-encadrant de Thèse
M. le Professeur Pierre GUERIN, Directeur de Thèse

Université de Lyon, UPSP 2011-03-101 ICE, VetAgro Sup - Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, 69280 France

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

| | |
|---|---|
| **Président de l'Université** | **M. François-Noël GILLY** |
| Vice-président du Conseil d'Administration | M. le Professeur Hamda BEN HADID |
| Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire | M. le Professeur Philippe LALLE |
| Vice-président du Conseil Scientifique | M. le Professeur Germain GILLET |
| Secrétaire Général | M. Alain HELLEU |

## *COMPOSANTES SANTE*

| | |
|---|---|
| Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard | Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE |
| Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux | Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN |
| UFR d'Odontologie | Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS |
| Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA. |
| Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation | Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON |
| Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine | Directeur : M. le Professeur P. FARGE |

## *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

| | |
|---|---|
| Faculté des Sciences et Technologies | Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI |
| Département Biologie | Directeur : M. le Professeur F. FLEURY |
| Département Chimie Biochimie | Directeur : Mme le Professeur H. PARROT |
| Département GEP | Directeur : M. N. SIAUVE |
| Département Informatique | Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE |
| Département Mathématiques | Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN |
| Département Mécanique | Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID |
| Département Physique | Directeur : Mme S. FLECK |
| Département Sciences de la Terre | Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL |
| UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives | Directeur : M. C. COLLIGNON |
| Observatoire de Lyon | Directeur : M. B. GUIDERDONI |
| Polytech Lyon | Directeur : M. P. FOURNIER |
| Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique | Directeur : M. G. PIGNAULT |
| Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 | Directeur : M. C. VITON |
| Institut Universitaire de Formation des Maîtres | Directeur : M. R. BERNARD |
| Institut de Science Financière et d'Assurances | Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS |

# ***Remerciements***

Une thèse n'est pas uniquement synonyme d'expérimentations scientifiques. Il s'agit aussi d'une aventure humaine où les rencontres sont tout aussi épanouissantes que la recherche proprement dite. J'espère que les personnes m'ayant aidé lors de cette thèse se rendront compte dans ces remerciements de toute la reconnaissance et l'estime que je peux avoir pour eux.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury. En particulier, je veux adresser mes sincères remerciements à Monsieur Jean-François Guérin pour m'avoir fait l'honneur d'en assurer la présidence.

Je veux aussi assurer toute mon estime à Madame Nicole Hagen-Picard et Monsieur Francis Fiéni pour avoir accepté la lourde tâche de rapporter sur ce travail de thèse et nous avoir fait profité de votre savoir et de votre expertise.

Je tiens bien évidemment à exprimer toute ma reconnaissance aux différentes personnes qui m'ont encadré lors de ces trois années.

Et je commencerai par Madame Anne Baudot et Monsieur Gérard Louis qui ont eu la tâche difficile de me faire découvrir les joies de la thermodynamique. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre accueil lors de mes nombreuses visites à l'université, pour les longues heures de tests, pour votre rigueur scientifique et pour m'avoir si bien guidé dans ce domaine qui semblait si abstrait à mes yeux de biologiste. J'espère sincèrement que cette thèse n'est que le début d'une collaboration plus longue et fructueuse.

Je voudrais dire toute mon estime à Monsieur Samuel Buff. Lors de nos longues discussions scientifiques, ton encadrement, tes connaissances, ton sens de la rhétorique et de la formulation m'ont permis de comprendre toute l'importance de la réflexion et de la précision lors d'un travail scientifique. J'essayerai de mettre en œuvre le mieux possible tous les conseils que tu as pu me donner.

Je voudrais assurer Monsieur Thierry Joly de toute ma reconnaissance. Je sais que tu n'aimes pas les remerciements trop appuyés. Alors je te dirai juste que sans ta bonne humeur perpétuelle, ton sens aigu de la pratique et ton esprit de synthèse, une bonne partie de cette thèse n'aurait pas été possible.

Et pour finir, je tiens à remercier Pierre Guérin sans qui je ne serai pas là où j'en suis aujourd'hui. Car, en plus d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, vous avez aussi encadré ma thèse vétérinaire, mes premières années d'enseignement et m'avez guidé tout au long du cheminement qui me mène aujourd'hui aux portes d'un concours de Maître de conférences. Merci pour votre patience, vos conseils éclairés et votre gentillesse. J'espère que vous comprendrez combien il est important pour moi de pouvoir profiter de votre expérience et de votre savoir.

Enfin, je veux remercier la société Stem Alpha et plus particulièrement son président, Monsieur Licari, pour avoir gracieusement fourni le CRYO3 utilisé lors de cette étude.

**Evaluation thermodynamique et biologique d'un substituant synthétique aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères**

Plusieurs composés présents dans les solutions de cryoconservation pour embryons sont source de préoccupations : soit du point de vue sanitaire à cause de leur origine animale, soit du fait de leur rôle potentiellement mutagène, notamment pour certains cryoprotecteurs pénétrants. Leur retrait ou leur substitution par des composés chimiquement définis pourrait donc constituer une amélioration sensible des techniques de cryoconservation des embryons. C'est dans ce cadre de réflexion que s'inscrit notre travail.

Souvent, la conception et la mise en œuvre des protocoles de cryoconservation sont empiriques. Il en résulte de nombreuses variations entre les études qui rendent la comparaison des résultats obtenus d'autant plus difficile. Dans notre démarche, deux approches complémentaires ont été associées :

- la première, physique, s'appuie sur l'utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) pour standardiser la comparaison des différentes solutions de congélation lente. Ainsi, les propriétés thermodynamiques de solutions contenant un substituant défini ont été caractérisées et comparées à celles de solutions contenant des produits de référence (sérum de veau fœtal ou albumine bovine sérique) ;
- la seconde, biologique, a consisté à congeler des embryons de lapins produits *in vivo* et des embryons bovins produits *in vitro*, puis à analyser les taux de survie après culture *in vitro* et/ou transferts. Cette approche a permis d'objectiver les propriétés biologiques des solutions ainsi définies.

Nos résultats confirment qu'il est judicieux d'utiliser une approche thermodynamique pour sélectionner des molécules chimiquement différentes des composés habituellement utilisés.

**Mots clés**

Congélation lente, substituant, produits d'origine animale, calorimétrie différentielle à balayage, cryobiologie, embryons de lapins, embryons de bovins produits *in vitro*

**Discipline**

Biotechnologies de la reproduction

**UPSP I.C.E. – Thématique Cryobiologie**

VETAGRO SUP - Campus Vétérinaire de Lyon
1 Avenue Bourgelat
F-69280 Marcy l'Etoile

**Thermodynamic and biological evaluation of a synthetic substitute for products of animal origin in mammal embryo cryopreservation solutions**

Several compounds in embryo cryopreservation solutions are a source of concern: products of animal origin because of the sanitary risks, and the permeating cryoprotectants because of their potential mutagenic effect. Removing or substituting these compounds with chemically defined products might improve embryo cryopreservation technics.

Conception and use of cryopreservation protocols are often empirical. This empiricism leads to many variations between the studies which make a comparison between results all the more difficult. In our study, two complementary approaches were associated:

- the first approach (physical) consisted of using the differential scanning calorimetry to standardize the comparison between different slow-freezing solutions. So, the thermodynamic properties of solutions containing a potential substitute were characterized and compared to those obtained with solutions containing reference products (fetal calf serum and bovine serum albumin) ;
- the second approach (biological) consisted of using freezing of *in vivo*-produced rabbit embryos or freezing of *in vitro*-produced bovine embryos in order to evaluate survival rates after *in vitro* culture or transfer. This approach allowed the evaluation of the biological properties of the slow-freezing solutions.

Our results confirm that the use of a thermodynamic approach is judicious to select molecules which are chemically different from those usually used in cryopreservation solutions.

**Key Words**

Slow-freezing, substitute, products of animal origin, differential scanning calorimetry, cryobiology, rabbit embryos, *in vitro*-produced bovine embryos

# Table des matières

**Introduction générale ..... 11**

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 13

**La cryobiologie des embryons ..... 15**

**I. Principes de base de cryobiologie ..... 15**

A. Nucléation et cristallisation ..... 15

B. Dommages cellulaires lors d'un processus de refroidissement ..... 17

*1. Dommages liés à la formation de glace ..... 17*

*2. Dommages liés à des altérations de la membrane plasmique ..... 19*

*3. Dommages liés à des altérations du cytosquelette ..... 21*

*4. Dommages osmotiques ..... 21*

*5. Autres dommages ..... 22*

C. Les cryoprotecteurs ..... 22

*1. Les cryoprotecteurs pénétrants ..... 23*

*2. Les cryoprotecteurs non pénétrants ..... 24*

D. Les différents protocoles de cryoconservation pour embryons ..... 25

*1. La congélation lente ..... 26*

*2. La vitrification ..... 29*

**II. Cryoconservation des embryons de bovins produits *in vitro* et des embryons de lapins ..... 32**

A. Cryoconservation des embryons de bovins produits *in vitro* ..... 32

*1. Particularités des embryons bovins produits in vitro ..... 32*

*2. Améliorer la résistance des embryons produits in vitro à la cryoconservation ..... 33*

*3. Principaux protocoles de cryoconservation utilisés pour les embryons de bovins produits in vitro ..... 36*

B. Cryoconservation des embryons de lapins ..... 40

**III. Aspects sanitaires liés à la cryoconservation ..... 43**

A. Survie des microorganismes à basse température et contamination des embryons 43

B. Risques sanitaires engendrés par l'utilisation de produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation ..... 44

C. Substituants aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères ..... 45

*1. Acide hyaluronique ..... 45*

*2. Alcool polyvinylique ..... 46*

*3. Polyvinylpyrrolidone ..... 47*

*4. Surfactants ..... 48*

*5. Dextrans et Ficoll ..... 49*

*6. Peptones végétales ..... 50*

**La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ..... 51**

**I. Principe de la calorimétrie différentielle à balayage ..... 51**

A. Fonctionnement d'un calorimètre différentiel à balayage par compensation de puissance ..... 51

B. Lecture des thermogrammes lors de la caractérisation de solutions de congélation lente ..... 52

*1. Présentation d'un thermogramme ..... 53*

*2. Grandeurs thermodynamiques utilisées pour la caractérisation de solutions de congélation lente ..... 54*

**II. Utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage en cryobiologie ..... 55**

A. Utilisation de la DSC dans l'étude de protocoles de congélation lente ..... 56

*1. Caractérisation de solutions de congélation lente ..... 56*

*2. Optimisation de protocoles de congélation lente ..... 57*

*3. Elaboration de diagrammes de phase de solutions contenant un cryoprotecteur 61*

B. Autres utilisations de la DSC en cryobiologie ..... 62

*1. Utilisation de la DSC dans l'étude de protocoles de vitrification ..... 62*

*2. Etude de la cristallisation dans les cellules et organismes vivants ..... 64*

*3. Aide à la compréhension des mécanismes naturels de résistance au froid des animaux ..... 67*

*4. Optimisation de protocoles de cryoconservation chez les plantes ..... 67*

# ETUDE EXPERIMENTALE ..... 69

**Evaluation du CRYO3 dans des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins et embryons de bovins produits *in vitro* ..... 71**

**I. Matériel et méthodes ..... 71**

A. Première partie : Evaluation thermodynamique de solutions utilisées pour la congélation d'embryons de lapins et de bovins produits *in vitro* ..... 71

*1. Elaboration des solutions de cryoconservation ..... 71*

*2. Evaluation thermodynamique ..... 73*

B. Deuxième partie : Evaluation biologique *in vitro* chez les embryons de lapins et de bovins produits *in vitro* ..... 75

*1. Solutions utilisées ..... 75*

*2. Embryons de lapins ..... 75*

*3. Embryons de bovins produits in vitro ..... 77*

C. Troisième partie : Evaluation biologique *in vivo* sur les embryons de lapins ..... 78

*1. Solutions utilisées ..... 79*

*2. Récupération des embryons et protocole de congélation ..... 79*

*3. Protocole de transfert et évaluation de la survie embryonnaire ..... 80*

D. Analyses statistiques ..... 80

**II. Résultats ..... 81**
A. Evaluation thermodynamique ..... 81
*1. Solutions pour embryons de lapins ..... 81*
*2. Solutions pour embryons bovins produits in vitro ..... 84*
*3. Solutions utilisées lors de l'approche in vivo ..... 86*
B. Evaluation biologique ..... 86
*1. Evaluation in vitro ..... 86*
*2. Evaluation in vivo ..... 87*
**III. Discussion ..... 87**
A. Variabilité des résultats thermodynamiques ..... 88
*1. Origine de cette variabilité ..... 88*
*2. Conséquences biologiques de cette variabilité ..... 89*
B. Influence de différents SVF sur les propriétés thermodynamiques de solutions de cryoconservation ..... 89
C. Comparaison des propriétés thermodynamiques des solutions utilisées comme références ..... 91
D. Comparaison du CRYO3 et des composés d'origine animale ..... 93
*1. Approche thermodynamique ..... 93*
*2. Approche biologique ..... 94*
**IV. Conclusions ..... 95**

**Evaluation de l'évolution des propriétés thermodynamiques de solutions de cryoconservation conservées à -20°C : influence de la présence d'antibiotiques ..... 97**

**I. Matériel et méthodes ..... 97**
**II. Résultats ..... 98**
A. Température de fin de fusion à l'équilibre ..... 98
B. Variation d'enthalpie de cristallisation ..... 98
**III. Discussion et conclusions ..... 99**

**Conclusion générale et perspectives ..... 101**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 105**

**PUBLICATIONS ..... 119**

# Liste des illustrations

## Liste des tableaux :

Tableau 1 : Résultats de viabilité *in vitro*, d'éclosion *in vitro* et de viabilité *in vivo* après transfert, de blastocystes bovins produits *in vitro* et cryoconservés, selon les principaux protocoles de congélation lente ..... 37
Tableau 2 : Résultats de viabilité *in vitro*, d'éclosion *in vitro* et de viabilité *in vivo* après transfert, de blastocystes bovins produits *in vitro* et cryoconservés, selon les principaux protocoles de vitrification ..... 39
Tableau 3 : Taux de survie *in vitro* et *in vivo* obtenus lors des principaux protocoles de congélation lente et vitrification pour embryons de lapins ..... 41
Tableau 4 : Vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement de solutions aqueuses contenant un cryoprotecteur. ..... 63
Tableau 5 : Embryons, solutions et approches utilisés lors de l'évaluation du CRYO3 ..... 72
Tableau 6 : Reproductibilité des mesures pour deux échantillons de référence ..... 74
Tableau 7 : Reproductibilité des mesures en fonction de la masse de l'échantillon ..... 74
Tableau 8 : solutions utilisées et nombre d'embryons congelés et transférés lors des expérimentations *in vivo* ..... 79
Tableau 9 : Caractéristiques thermodynamiques des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins (moyenne ± SD) ..... 81
Tableau 10 : Caractéristiques thermodynamiques des solutions de cryoconservation pour embryons bovins produits *in vitro* (moyenne ± SD) ..... 84
Tableau 11 : Propriétés thermodynamiques des solutions utilisées lors de l'approche *in vivo* (moyenne ± SD) ..... 86
Tableau 12 : Taux de survie et d'éclosion après congélation, décongélation puis culture *in vitro* d'embryons bovins produits *in vitro* ..... 86
Tableau 13 : Caractéristiques thermodynamiques des solutions de cryoconservation pour embryons de bovins contenant un SVF (moyenne ± SD) ..... 91

## Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique des vitesses de nucléation et de croissance des cristaux en fonction de la température (d'après [Baudot, 1997]) ..... 16
Figure 2 : Représentation 3D d'une cellule avant (a) et après (b) exposition à une solution hypertonique [Yoshimori et Takamatsu, 2009] ..... 18
Figure 3 : Représentation schématique des protocoles de congélation équilibrée et vitrification (d'après [Ménézo, 2004]) ..... 25
Figure 4 : Courbes de survie en U inversé en fonction du type de cellules (d'après [Mazur et al., 2008]) ..... 26
Figure 5 : Courbe de survie obtenue pour un type cellulaire donné, en présence de cryoprotecteurs et pour un réchauffement rapide [Baudot, 1997] ..... 27
Figure 6 : Photos d'ovocytes de souris sous cryomicroscopie montrant la déshydratation cellulaire pendant les phases de refroidissement puis de réchauffement d'un processus de congélation lente [Leibo et Pool, 2011] ..... 28
Figure 7 : Cryoloop [Lane et al., 1999] ..... 40
Figure 8 : Photo du DSC diamond (a) et de la tête de mesure du DSC (b) (manuel d'utilisation du DSC Diamond) ..... 52

Figure 9 : Schéma de la tête de mesure d'un DSC par compensation de puissance ..... 52
Figure 10 : Exemple de thermogramme et schéma de son analyse..... 53
Figure 11 : Schéma montrant la superposition des thermogrammes permettant l'obtention de $Q_{initiale}$ et $Q_{finale}$ et le calcul de la différence totale de chaleur dégagée ($\Delta Q$) (d'après [Devireddy et al., 2004]) ..... 58
Figure 12 : Schéma montrant la superposition des thermogrammes permettant l'obtention de $Q_{initiale}$ et $Q_{finale}$ et le calcul de la différence partielle de chaleur dégagée à la température $T$ ($\Delta Q(T)$) (d'après [Devireddy et al., 2004]) ..... 59
Figure 13 : Schéma de la contraction volumétrique cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement et courbes d'ajustement (d'après [Devireddy et al., 2004]) ..... 60
Figure 14 : Diagramme de phase partiel pour le système eau, NaCl, saccharose (d'après [Kleinhans et Mazur, 2007]) ..... 62
Figure 15 : Thermogramme (a) et schéma explicatif (b) permettant la visualisation de huit pics de cristallisation intracellulaire (en rouge) survenue au sein de huit ovocytes de Xénope (d'après [Kleinhans et al., 2006])..... 65
Figure 16 : Thermogramme permettant la visualisation de la cristallisation survenant dans une solution contenant des levures (d'après [Seki et al., 2009] )..... 66
Figure 17 : Schéma global de l'étude sur l'évaluation du CRYO3..... 72
Figure 18 : Diagramme des valeurs de $T_m$ des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins..... 81
Figure 19 : Diagramme des valeurs de $\Delta H$ des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins..... 82
Figure 20 : Diagramme des valeurs de $T_c$ des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins contenant du SVF ..... 82
Figure 21 : Diagramme des valeurs de $T_m$ des solutions de cryoconservation pour embryons bovins produits *in vitro* ..... 85
Figure 22 : Diagramme des valeurs de $\Delta H$ des solutions de cryoconservation pour embryons bovins produits *in vitro* ..... 85
Figure 23 : Diagramme des valeurs de $\Delta H$ des solutions de cryoconservation utilisées comme référence ..... 92
Figure 24 : Evolution des valeurs moyennes de $T_m$ au cours du temps ..... 98
Figure 25 : Evolution des valeurs moyennes de $\Delta H$ au cours du temps ..... 99

# Liste des abréviations

BHV-1 : Bovine Herpes Virus 1
BSA : Albumine bovine sérique
BVDV : Bovine Viral Diarrhea virus
DG : Diagnostic de gestation
DMSO : Diméthyle sulfoxyde
D-PBS : Dulbecco's phosphate buffered saline
DSC : Calorimétrie différentielle à balayage
EG : Ethylène glycol
FIV : Fertilisation *in vitro*
IA : Insémination animale
IETS : International embryo transfer society
NBCS : Sérum de veau nouveau-né
OPS : Open pulled straw
PES : Ethosulfate de phénazine
PVA : Alcool polyvinylique
PVP : Polyvinylpyrrolidone
SD : Déviation Standard
SOF : Synthetic oviduct fluid
SVF : Sérum de veau fœtal
SVO : Sérum de vache en œstrus
TDE : Encéphalopathie dégénérative transmissible
UV : Ultraviolets

# Liste des symboles

$A_c$ : Aire de la surface membranaire effective pour le transport d'eau
$B$ : Vitesse de refroidissement constante
$\Delta H$ : Variation d'enthalpie de cristallisation
$\Delta H_{eau}$ : Chaleur latente de fusion de la glace
$E_{lp}$ : Energie d'activation de la perméabilité de la membrane cellulaire à l'eau
$L_p$ : Perméabilité de la membrane cellulaire à l'eau
$L_{pg}$ : Perméabilité de référence de la membrane cellulaire à l'eau à 273,15 K
$n_{cpa}$ : Nombre de moles de cryoprotecteurs
$n_s$ : Nombre d'osmoles en sels
$\varphi_s$ : Constante de dissociation des sels
$\rho$ : Densité de l'eau
$Q$ : Chaleur de cristallisation
$Q_{max}$ : Chaleur maximale de cristallisation
$R$ : Constante des gaz parfaits
$T_c$ : Température de cristallisation
$T_m$ : Température de fin de fusion à l'équilibre
$T_{ph}$ : Température de changement de phase
$T_R$ : Température de référence (273,15 K)
$V_0$ : Volume initial ou isotonique des cellules
$V_b$ : Volume osmotiquement inactif des cellules
$v.v^{-1}$ : volume/volume
$v_{cpa}$ : Volume molaire des cryoprotecteurs
$v_w$ : Volume molaire d'eau
$w.w^{-1}$ : poids/poids

# Introduction générale

Depuis 40 ans et la naissance du premier veau issu du transfert d'un embryon congelé [Wilmut et Rowson, 1973], les embryons de nombreuses espèces de mammifères ont été cryoconservés avec succès (souris, vache, chèvre, mouton, lapin… etc.) [Woods et al., 2004]. Dans l'espèce humaine, la première gestation issue du transfert d'un embryon préalablement congelé a ainsi été établie en 1983 [Trounson et Mohr, 1983] tandis que la première gestation menée à terme a eu lieu en 1984 [Zeilmaker et al., 1984]. A l'heure actuelle, la cryoconservation d'embryons humains représente une aide importante pour les couples rencontrant des problèmes de fertilité. Néanmoins, certains composés présents dans les solutions de cryoconservation constituent une source de préoccupations. Les premiers d'entre eux sont les composés macromoléculaires, tels que le sérum de veau fœtal (SVF) ou l'albumine bovine sérique (BSA). Ces produits d'origine animale engendrent en effet différents risques, dont le plus important est d'ordre sanitaire. Ces deux produits, de par leur origine bovine, peuvent en effet être contaminés par de nombreux agents pathogènes parmi lesquels des virus, des bactéries, des levures, des champignons, des mollicutes (et en particulier des mycoplasmes), voire des prions [Dussurgel et al., 1994; Jochems et al., 2002; Even et al., 2006]. Ils représentent donc un risque de contamination pour les embryons, en particulier en espèces bovine (transmission de virus) et humaine (transmission de prions).

De plus, d'autres problèmes peuvent être rencontrés avec les SVF [Jochems et al., 2002; Even et al., 2006]. Ces derniers sont en effet des mélanges complexes comportant un grand nombre de constituants [Horvath et Seidel, 2006; Rauch et al., 2011] parmi lesquels des protéines (en particulier de la BSA), des vitamines, des hormones, des facteurs de croissance ou encore des substrats énergétiques [Hasler, 2010]. La composition des SVF étant dépendante d'un grand nombre de facteurs (alimentation des animaux, saison… etc.), une variabilité peut exister entre différents lots [Honn et al., 1975; Knepper et al., 1998; Horvath et Seidel, 2006]. De plus, parmi les nombreux constituants d'un SVF, un certain nombre ne sont pas identifiés [Ménézo et Khatchadourian, 1986]. L'association de ces éléments peut engendrer une variabilité des résultats obtenus avec des protocoles de cryoconservation. Enfin, la fabrication des SVF pose une question éthique se rapportant à la souffrance des fœtus [van der Valk et al., 2004]. En effet, le SVF est recueilli par ponction intracardiaque sur des fœtus recueillis après abattage des mères. Cette ponction n'étant pas toujours immédiate après l'abattage, la question de la sensibilité du fœtus à l'anoxie puis à la douleur est posée.

Dans ce cadre, le remplacement des produits d'origine animale pourrait constituer une amélioration sensible des méthodes de cryoconservation pour embryons, en particulier du point de vue sanitaire. Ce postulat est à la base du questionnement de ce travail. L'objectif de notre étude est donc double :

- L'évaluation de l'impact de l'origine des SVF sur les propriétés des solutions de congélation pour embryons ;
- L'évaluation des propriétés d'un substituant chimiquement défini (CRYO3, Réf. 5617, Stem Alpha, France) aux produits d'origine animale, dans les solutions de cryoconservation pour embryons.

Le CRYO3 est un produit entièrement synthétique dont la composition a fait l'objet d'un dépôt de brevet par la société STEM ALPHA (brevet n° 03 08206). Sa composition ainsi que la nature de certains composés ne sont donc pas exactement connus. Ce produit a été développé pour la congélation de cellules mononuclées humaines telles les cellules souches, en particulier les cellules souches hématopoïétiques. Il a déjà été utilisé avec succès pour la

cryoconservation de cellules souches issues du sang de cordon ombilical humain [Jurga et al., 2012].

Pour réaliser les évaluations, deux approches complémentaires ont été utilisées. Tout d'abord, une approche thermodynamique utilisant la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a permis la caractérisation physique de solutions de cryoconservation pour embryons contenant différents SVF ou du CRYO3. Dans un second temps, une évaluation biologique de ces solutions a été réalisée par culture *in vitro* et transfert embryonnaire d'embryons préalablement congelés.

Du fait que peu d'études ont eu pour objet la caractérisation de solutions de congélation lente par DSC, plusieurs études préliminaires ont été réalisées afin d'adapter notre procédure d'utilisation du DSC à l'étude de solutions de congélation lente. En particulier, une évaluation des différents facteurs permettant une bonne reproductibilité des mesures a été réalisée.

Concernant l'approche biologique, deux modèles d'études ont été choisis : les embryons de lapins et les embryons bovins produits *in vitro*. Ces deux espèces ont été choisies dans la mesure où leurs caractéristiques biologiques les rendent complémentaires.

Les embryons de lapins *(Oryctolagus cuniculus)* ont tout d'abord été sélectionnés car ils constituent un bon modèle pour la reproduction des mammifères, pour l'étude du développement embryonnaire précoce et pour la recherche biomédicale [Joly et al., 1998; Salvetti et al., 2006; Salvetti et al., 2007; Puschel et al., 2010]. De plus, la grande prolificité (dix lapereaux par portée en moyenne), le rythme de reproduction intensif (une mise bas tous les 42 jours) et le très bref intervalle de génération (inférieur à six mois) caractérisant cette espèce permettent l'acquisition rapide de résultats *in vitro* et *in vivo*.

Les embryons de bovins (*Bos taurus*) produits *in vitro* ont également été utilisés car ils constituent un bon modèle pour les techniques de reproduction assistée en médecine humaine [Ménézo et Hérubel, 2002; Adjaye et al., 2007]. En effet, les biotechnologies de la reproduction sont bien maîtrisées dans cette espèce, qu'il s'agisse de l'insémination artificielle (IA), du transfert embryonnaire, de la fertilisation *in vitro* (FIV) ou encore de la ponction échoguidée d'ovocytes.

Dans une première partie bibliographique, nous nous intéresserons aux bases de la cryobiologie, à la cryoconservation des embryons de lapins et de bovins produits *in vitro* ainsi qu'aux aspects sanitaires liés à la cryoconservation. Le principe de la DSC et son utilisation en cryobiologie seront ensuite abordés.

Dans une seconde partie expérimentale seront présentés les différents protocoles d'utilisation du CRYO3 pour la congélation lente d'embryons de lapins et de bovins ainsi que les résultats thermodynamiques et biologiques obtenus suite à leur évaluation.

# *Etude bibliographique*

Dans un premier temps, nous présenterons les principes de base nécessaires à la compréhension de la cryobiologie des embryons. Nous focaliserons ensuite notre propos sur la cryoconservation des embryons de lapins et de bovins produits *in vitro*, modèles utilisés lors de l'étude expérimentale. Nous aborderons enfin les différents aspects sanitaires relatifs à la cryoconservation des embryons, en particulier concernant l'utilisation des produits d'origine animale.

A cette partie succèdera la présentation de la méthode d'analyse thermodynamique utilisée lors de notre travail expérimental : la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Après avoir exposé les principes de cette méthode, nous nous intéresserons à ses différentes utilisations en cryobiologie, plus particulièrement dans le domaine de l'étude des solutions de congélation lente, sujet de notre étude expérimentale. Nous évoquerons également les aspects liés à la vitrification car ils constituent une ouverture potentielle pour de futures études.

# La cryobiologie des embryons

## I. Principes de base de cryobiologie

L'eau liquide joue un rôle essentiel dans la structure et la fonction des êtres vivants [Mazur, 2004]. Elle compose ainsi 60 à 85% des cellules. Lorsque la température diminue, la transformation de l'eau liquide en glace s'accompagne de profonds changements des milieux extra- et intracellulaire qui peuvent être délétères pour les cellules. La transition eau-glace est donc un phénomène d'importance critique en cryoconservation [Karlsson et Toner, 1996].

Nous nous intéresserons dans cette première partie au phénomène de cristallisation, aux dommages cellulaires que peut engendrer un refroidissement, puis aux molécules et protocoles pouvant protéger les embryons de ces altérations.

### *A. Nucléation et cristallisation*

Lorsque de l'eau liquide est refroidie, il existe une température à laquelle elle se transforme en une phase solide et stable : la glace [Muldrew et al., 2004]. Un cristal de glace est une structure solide composée de molécules d'eau agencées selon un motif se répétant à l'infini [Mazur, 2004]. Ce motif est représenté par une molécule d'eau centrale entourée par quatre molécules d'eau formant un tétraèdre. L'ensemble est relié par des liaisons hydrogènes établies entre un atome d'oxygène et deux atomes d'hydrogène. Parmi les particularités de l'eau, on peut noter l'augmentation de volume d'environ 9% associée à la cristallisation [Baudot, 1997]. Au niveau cellulaire, cette dilatation peut engendrer des dommages irréversibles. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes de formation de la glace afin de pouvoir les contrôler.

Lors d'un refroidissement, la formation de glace requiert un événement nucléant, c'est-à-dire la présence d'un événement permettant l'induction de la cristallisation [Meryman, 2007]. Deux types de nucléation existent. La plus courante en condition biologique est la nucléation hétérogène où la formation de glace est induite par la présence d'une impureté, appelée noyau de nucléation [Meryman, 1966; Muldrew et al., 2004]. La température à laquelle la cristallisation a lieu dépend de la taille des sites de nucléation [Meryman, 2007]. Plus les noyaux de nucléation sont petits, plus la température de cristallisation est basse, et inversement.

Lorsque la température de l'eau atteint -40°C, la taille nécessaire pour qu'un noyau de nucléation induise la cristallisation est d'environ 1 nm, soit la taille d'un groupe aléatoire de molécules d'eau [Meryman, 2007]. A cette température, la glace se forme donc de manière spontanée. On parle alors de nucléation homogène.

Une fois la cristallisation initiée, la croissance des cristaux ainsi que la structure de la glace dépendent de la vitesse de refroidissement, de la température de cristallisation et de l'état de surfusion de la solution au moment de la cristallisation [Meryman, 2007; Gosden et al., 2010].

Tout d'abord, la croissance des cristaux dépend de la viscosité de la solution [Karlsson et Toner, 1996; Morris et al., 2006]. La vitesse de cette croissance est schématisée dans la Figure 1.

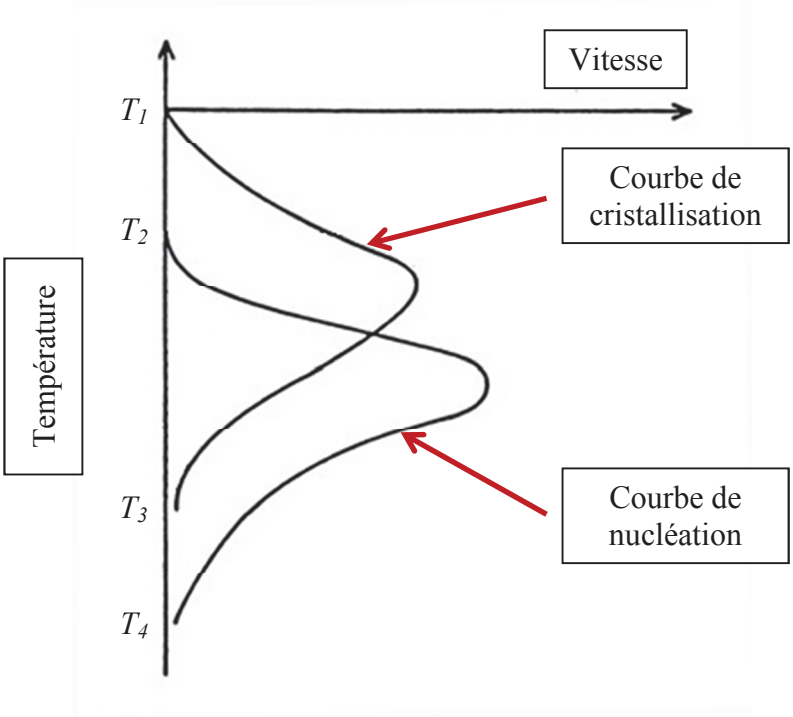



**Figure 1 : Représentation schématique des vitesses de nucléation et de croissance des cristaux en fonction de la température (d'après [Baudot, 1997])**
*Lors du refroidissement, la vitesse de cristallisation augmente avant celle de nucléation. Un refroidissement lent conduit donc à la formation d'un faible nombre de cristaux de grande taille. A l'inverse, lors du réchauffement, la vitesse de nucléation augmente avant celle de cristallisation. La probabilité d'apparition de la glace est donc plus importante au réchauffement qu'au refroidissement.*

Dans des solutions aqueuses, la croissance des cristaux se produit par diffusion de molécules d'eau depuis la solution adjacente jusqu'au cristal. Une augmentation de la viscosité diminue donc la diffusion des molécules d'eau et la croissance des cristaux. Or la viscosité de solutions aqueuses augmente lorsque la température baisse. Ainsi, lorsque la température baisse, la vitesse de croissance des cristaux augmente tout d'abord avant de diminuer du fait de l'augmentation de viscosité. Il est intéressant de remarquer que le domaine de nucléation se situe à des températures plus basses que le domaine de cristallisation. Lors d'un refroidissement lent, le début de la nucléation se produit alors que la vitesse de croissance des cristaux est déjà grande. Un refroidissement lent conduit donc à la formation d'un faible nombre de cristaux de grande taille [Meryman, 2007]. De plus, les travées de glace formées ont une surface lisse [Morris et al., 2006]. A l'inverse, un refroidissement rapide conduit à la formation de nombreux cristaux de petite taille [Meryman, 2007]. Les travées de glace formées ont une surface irrégulière avec présence de dendrites et contiennent des puits de solution non cristallisé [Morris et al., 2006].

Par ailleurs, lorsque la température d'une solution est inférieure à $T_1$ (Figure 1), l'apparition de glace est possible. Si la solution reste néanmoins liquide, elle entre dans un état instable, qualifié d'état de surfusion, qui se maintient tant qu'il n'y a pas de cristallisation. Plus l'abaissement de la température de la solution par rapport à $T_1$ est important au moment de la cristallisation, plus la structure de la glace est chaotique avec présence de cristaux de petite taille (10 µm) [Gosden et al., 2010]. Lorsque la cristallisation a lieu alors que l'état de surfusion est faible, la glace prend au contraire la forme de cristaux dendritiques ramifiés

uniformes et de taille plus importante (10-30 µm). Il semble ainsi nécessaire de limiter autant que possible l'état de surfusion lors de protocoles de congélation.

Enfin, il est intéressant de remarquer que, lors d'un réchauffement, les courbes de nucléation et de croissance des cristaux se succèdent « dans le bon sens » (Figure 1). La probabilité d'apparition de glace est donc plus importante au réchauffement qu'au refroidissement. Ceci explique en particulier que lors des procédures de cryoconservation, les vitesses de réchauffement appliquées doivent être supérieures aux vitesses de refroidissement, en particulier lors des protocoles de vitrification.

## *B. Dommages cellulaires lors d'un processus de refroidissement*

Tous les embryons subissent des dommages morphologiques et fonctionnels considérables lors d'un processus de refroidissement [Vajta et Kuwayama, 2006; Pereira et Marques, 2008]. Ces dommages dépendent de plusieurs facteurs tels que le stade embryonnaire, l'espèce, la perméabilité des membranes, la vitesse de refroidissement, l'origine des embryons (*in vivo* ou *in vitro*), leur qualité… etc.

Les dommages cellulaires lors d'un processus de refroidissement sont divers et n'ont pas encore été totalement élucidés [Karlsson et Toner, 1996; Mullen et Critser, 2007]. Néanmoins, ils peuvent être liés à la formation de glace, à des altérations de la membrane plasmique ou du cytosquelette, à des effets toxiques des cryoprotecteurs ou à des effets osmotiques [Vajta et al., 1997; Vajta, 2000; Vajta et Kuwayama, 2006].

### 1. Dommages liés à la formation de glace

La formation de cristaux de glace est une des causes les plus dangereuses de dommages dus au froid [Vajta et Kuwayama, 2006]. Plusieurs phénomènes sont à l'origine des altérations liées à cette formation.

#### *a) Stress mécanique*

L'apparition de glace extracellulaire est à l'origine de contraintes mécaniques sur les cellules [Ishiguro et Rubinsky, 1994; Karlsson et Toner, 1996; Takamatsu et Zawlodzka, 2006]. En effet, les cellules refroidies dans une solution sont séquestrées dans des canaux de solution liquide au milieu de solution cristallisée [Mullen et Critser, 2007]. Les interactions entre cellules et cristaux de glace peuvent donc conduire à des dommages, en particulier aux points de contact entre les cristaux et la membrane plasmique [Ashwood-Smith et al., 1988; Hubel et al., 1992]. Néanmoins, la morphologie des cristaux est extrêmement dépendante des conditions expérimentales. Les contraintes mécaniques peuvent donc varier fortement en fonction des protocoles de cryoconservation et il est très difficile de les quantifier.

#### *b) Augmentation des concentrations en solutés extra- et intracellulaires*

Lors de la formation de glace extracellulaire, les électrolytes extracellulaires se concentrent dans la phase liquide restante [Leibo et Pool, 2011]. Il en résulte plusieurs phénomènes à l'origine de dommages cellulaires.

Premièrement, l'augmentation de concentration en solutés extracellulaires engendre une force motrice qui entraîne une sortie de l'eau intracellulaire et donc une déshydratation de

la cellule [Seki et Mazur, 2009]. On parle d'effet de solution [Karlsson et Toner, 1996]. Sous l'effet de la déshydratation, les cellules se contractent et leur membrane se déforme nettement (Figure 2) [Yoshimori et Takamatsu, 2009].

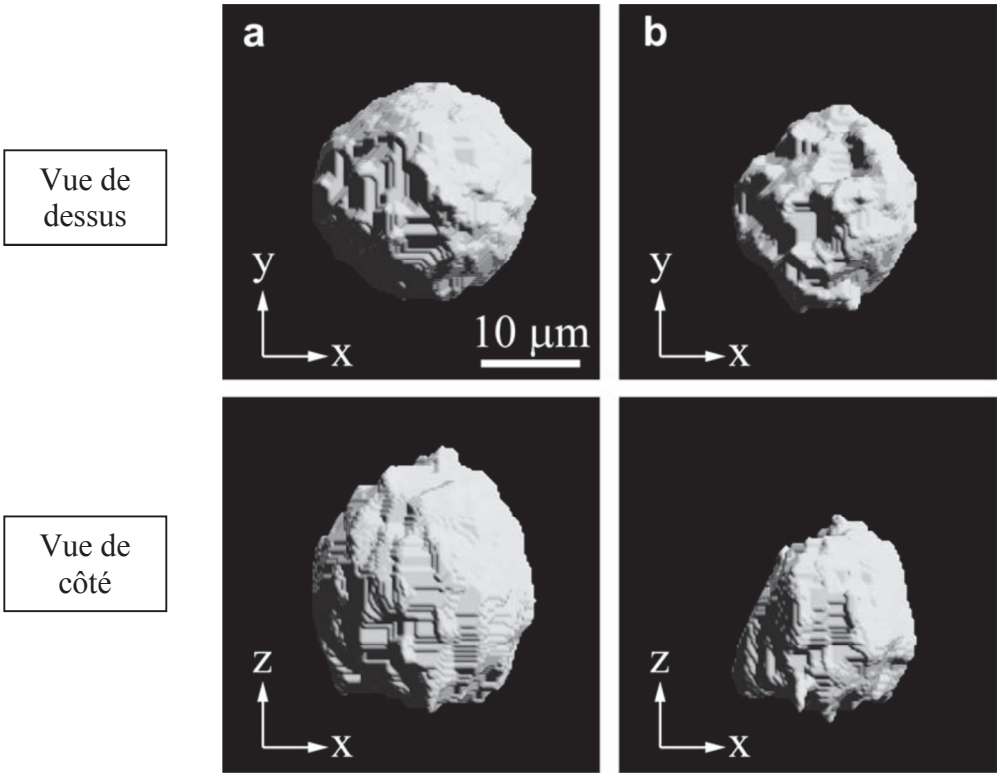



**Figure 2 : Représentation 3D d'une cellule avant (a) et après (b) exposition à une solution hypertonique [Yoshimori et Takamatsu, 2009]**
*Après exposition à la solution hypertonique, la cellule se contracte du fait de la sortie d'une partie de l'eau intracellulaire. On parle d'effet de solution.*

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les dommages engendrés par l'effet de solution. D'une part, la déshydratation des cellules peut engendrer une transition de phase des lipides de la membrane plasmique, qui passent d'une phase lamellaire à une phase hexagonale [Gordon-Kamm et Steponkus, 1984a; Pihakaski-Maunshach et Kukkonen, 1997]. Cette transition pourrait altérer la structure de cette dernière, et donc ses propriétés, en particulier concernant sa perméabilité à l'eau. D'autre part, la déshydratation des cellules peut induire, lors du refroidissement, une internalisation de vésicules issues de la membrane plasmique [Gordon-Kamm et Steponkus, 1984b]. L'absence de réincorporation de ces vésicules durant le réchauffement serait responsable d'une diminution de la surface de la membrane plasmique. La réhydratation et le retour au volume isotonique pourrait donc engendrer un éclatement de la cellule. Enfin, des dommages pourraient être issus du rapprochement de surfaces ou de groupes polaires séparés normalement par de l'eau [Crowe et al., 2004]. Ce rapprochement pourrait induire une altération de la structure de la membrane plasmique et des protéines intracellulaires.

Deuxièmement, l'augmentation de la concentration en solutés extracellulaires est à l'origine d'une augmentation de la concentration en solutés intracellulaires. Deux mécanismes sont à l'origine de ce phénomène. D'une part, la déshydratation intracellulaire résultant de l'effet de solution engendre une augmentation de la concentration des solutés présents dans le cytoplasme [Muldrew et al., 2004]. D'autre part, l'augmentation de concentration

extracellulaire peut être à l'origine du passage dans le cytoplasme de solutés extracellulaires normalement non perméables [Muldrew et al., 2004; Meryman, 2007]. Bien que l'augmentation de la concentration en solutés intracellulaires ne soit pas nécessairement létale, elle peut limiter la tolérance des cellules lors de leur suspension dans une solution hypotonique en augmentant la pression osmotique intracellulaire. Elle augmente ainsi les risques d'éclatement par pénétration d'eau lors du réchauffement. Elle pourrait également modifier l'équilibre osmotique nécessaire au bon fonctionnement des cellules et engendrer ainsi de nombreuses modifications biophysiques et biochimiques potentiellement létales.

### *c) Cristallisation intracellulaire*

La formation de glace intracellulaire, même dans des proportions très faibles, peut engendrer des dommages très importants et donc la mort cellulaire [Mullen et Critser, 2007]. Le volume maximal de glace intracellulaire au-delà duquel la mort cellulaire survient se situerait ainsi entre 2% et 3,7% du volume total d'eau intracellulaire pour des hépatocytes [Karlsson et al., 1993]. Les différentes procédures de cryoconservation ont donc pour but d'éviter sa formation [Campos-Chillon et al., 2006].

Les phénomènes par lesquels la glace intracellulaire se forme sont encore mal connus [Muldrew et al., 2004]. Néanmoins, il semble nécessaire de distinguer les phénomènes responsables de la formation de glace intracellulaire en fonction de la température de cristallisation [Mazur, 2004]. A des températures inférieures à -30°C, cette formation est une conséquence de l'action de noyaux de nucléation hétérogène présents dans la cellule. La faible quantité de noyaux présents dans le milieu intracellulaire explique les températures basses de cristallisation. Pour des températures supérieures à -30°C, les mécanismes sont encore méconnus [Mazur, 2004; Muldrew et al., 2004]. Néanmoins, la présence de glace extracellulaire en contact étroit avec la cellule semble être un élément déterminant. Trois hypothèses principales existent concernant l'induction de la cristallisation intracellulaire par de la glace extracellulaire: *i)* induction par le passage de glace extracellulaire au travers de la membrane plasmique via des pores, *ii)* induction par le passage de glace extracellulaire au travers de lésions de la membrane plasmique et *iii)* induction par la glace extracellulaire de changements structuraux de la membrane plasmique permettant de transformer la surface interne de la membrane en site de nucléation hétérogène.

De même que pour sa formation, les mécanismes par lesquels la glace intracellulaire endommage les cellules font encore l'objet d'un questionnement [Karlsson et Toner, 1996; Muldrew et al., 2004]. L'hypothèse la plus répandue lie les dommages à des lésions mécaniques engendrées par la croissance du cristal, en particulier au niveau de la membrane plasmique ou des organelles. D'autres hypothèses liées à l'effet de solution, au choc thermique ou encore à la formation de bulles de gaz ont également été avancées. Il est néanmoins nécessaire de remarquer que la formation de glace intracellulaire seule ne peut expliquer tous les dommages. D'autres facteurs tels que la quantité et la taille des cristaux, leur localisation et les mécanismes de leur formation ont également un rôle.

## 2. Dommages liés à des altérations de la membrane plasmique

La membrane plasmique est un des principaux sites subissant des dommages lors d'un refroidissement [Horvath et Seidel, 2006]. Elle peut en effet subir des altérations dues au refroidissement (« chilling injuries »), à un stress oxydant ou, comme dit précédemment, à la formation de glace qui peut provoquer sa rupture [Dobrinsky et al., 2000].

Les « chilling injuries » sont définies comme des dommages engendrés par des températures subphysiologiques en l'absence de glace [Horvath et Seidel, 2006; Mazur et al., 2008]. Ces altérations doivent être séparées en deux catégories : les lésions dues à l'exposition au froid (« cold injuries ») et les lésions dues à une vitesse de descente en température trop importante (choc thermique ou « cold choc ») [Mazur et al., 2008]. Les premières augmentent lorsque le temps passé à basse température est plus long. Elles sont donc limitées par un refroidissement rapide. A l'inverse, le choc thermique est accentué par des vitesses de refroidissement rapides. Chaque type cellulaire présente une sensibilité plus ou moins importante aux « cold injuries » ou au choc thermique. En conséquence, les protocoles de cryoconservation doivent être adaptés aux différentes cellules cryoconservées.

Les « cold injuries » sont classiquement imputées à un changement de phase des lipides membranaires [Mazur et al., 2008]. En effet, lorsque la température diminue, les lipides de la membrane plasmique sont affectés par une transition de phase qui les amène d'une phase liquide cristalline à une phase solide également appelée phase de gel [Horvath et Seidel, 2006]. Les changements provoqués par cette transition peuvent engendrer des altérations de la membrane, en particulier à la température où cette transition s'effectue. Parmi les différentes caractéristiques de la membrane plasmique, sa composition joue un rôle particulièrement important dans sa sensibilité au refroidissement. Modifier cette composition a donc été une des solutions envisagées pour diminuer l'impact des « cold injuries ». Il a ainsi été observé qu'enrichir la membrane plasmique en cholestérol ou en acides gras polyinsaturés augmentait sa résistance [Hochi et al., 1999; Zeron et al., 2002; Horvath et Seidel, 2006].

Les explications du choc thermique sont quant à elles bien différentes. L'une d'entre elles a été proposée par McGrath et est basée sur les propriétés mécaniques de la membrane plasmique à basse température ([McGrath, 1987] cité par [Mazur et al., 2008]). Lors d'un refroidissement, la surface de la membrane plasmique diminue du fait de sa contraction. Cette diminution s'accompagne d'une augmentation de la pression hydrostatique qui engendre une sortie d'eau intracellulaire. Lorsque le refroidissement est lent, la sortie d'eau est suffisante pour compenser la diminution de surface de la membrane, ce qui évite sa rupture. A l'inverse, si le refroidissement est trop rapide, la sortie d'eau n'est pas suffisante et la membrane se rompt. Il est intéressant de remarquer que les cellules les plus sensibles au choc thermique sont les spermatozoïdes et les globules rouges. Ces deux cellules, contrairement à d'autres, ne possèdent ni plis ni microvillosités sur leur membrane plasmique. La présence de plis et de microvillosités pourrait en effet représenter une « réserve » de membrane qui limiterait l'impact de la contraction thermique. Cette hypothèse est renforcée par la faible sensibilité au choc thermique d'autres types cellulaires possédant des plis et des microvillosités de la membrane plasmique, ce qui est le cas des embryons.

Les protocoles de cryoconservation sont également à l'origine d'un stress oxydant [Bilodeau et al., 2000]. L'augmentation de la concentration intracellulaire en radicaux libres oxygénés qui en résulte pourrait être à l'origine d'une peroxydation des phospholipides de la membrane plasmique [Lane et al., 2002]. Or ce phénomène est un des mécanismes par lesquels les membranes peuvent être endommagées et leurs fonctions physiologiques altérées. Les causes exactes de ces dommages ne sont pas encore totalement élucidées [Wong-Ekkabut et al., 2007]. Il a néanmoins été observé qu'une peroxydation des lipides membranaires peut être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité d'une bicouche lipidique, ce qui peut perturber les gradients ioniques nécessaires au métabolisme des cellules. Elle peut également être responsable d'une perturbation de la structure de la membrane plasmique, d'une diminution de son épaisseur ou d'une modification de sa fluidité. L'addition d'antioxydants dans des solutions de cryoconservation pourrait donc permettre d'améliorer les taux de survie embryonnaire après cryoconservation. Cela a été confirmé dans une étude dans laquelle

l'ajout d'acide ascorbique a favorisé le développement d'embryons de souris après congélation ou vitrification [Lane et al., 2002].

## 3. Dommages liés à des altérations du cytosquelette

Le cytosquelette est un autre composant cellulaire fréquemment endommagé [Dobrinsky et al., 2000]. Il semble en effet être sensible à la présence de cryoprotecteurs et à leur concentration. Une étude a ainsi montré qu'une exposition à de fortes concentrations en cryoprotecteurs lors d'un processus de vitrification peut engendrer une altération du cytosquelette par désorganisation des microtubules et des microfilaments [Overström et al., 1993]. Cette désorganisation n'était pas observée lors d'un protocole de congélation lente nécessitant des concentrations moindres en cryoprotecteurs. De la même manière, un processus de vitrification peut être à l'origine d'une altération de la configuration du fuseau méiotique par désorganisation ou désassemblage des microtubules [Pereira et Marques, 2008].

Le cytosquelette semble également être sensible au processus de refroidissement et réchauffement proprement dit. Une congélation lente et un réchauffement peuvent ainsi conduire à une diminution importante de sa qualité et induire des morts cellulaires en l'absence d'effets toxiques d'un cryoprotecteur [Tharasanit et al., 2005].

La stabilisation du cytosquelette pourrait donc favoriser la survie des cellules cryoconservées [Pereira et Marques, 2008; Saragusty et Arav, 2011]. Différents stabilisateurs du cytosquelette existent et ont été utilisés lors de protocoles de cryoconservation. La cytochalasine B en particulier est un inhibiteur réversible de la polymérisation de l'actine. Elle permet la dépolymérisation temporaire des microfilaments présents dans les cellules et augmenterait ainsi la flexibilité du cytosquelette et de la membrane plasmique [Tharasanit et al., 2005; Pereira et Marques, 2008]. D'autres stabilisateurs tels que la colchicine et le taxol peuvent également être utilisés.

L'ajout de cytochalasine B seule a permis de favoriser la survie d'embryons porcins après vitrification et de blastocystes équins après congélation lente [Dobrinsky et al., 2000; Tharasanit et al., 2005]. Dans les deux études, l'effet protecteur de la cytochalasine B semblait s'orienter préférentiellement vers les embryons de grande taille (blastocystes porcins expansés et éclos ; blastocystes équins les plus grands). Il est également nécessaire de noter que le cytosquelette des embryons équins congelés en présence de cytochalasine B n'a pas retrouvé d'aspect normal après décongélation, et ce, même après 6 h de culture *in vitro* en l'absence de cytochalasine [Tharasanit et al., 2005]. Cette absence de régénération pourrait être due aux dommages engendrés par le processus de congélation sur les mitochondries, organelles nécessaires aux mécanismes de réparation du cytosquelette.

La cytochalasine B, la colchicine et le taxol ont également été utilisés lors de la cryoconservation d'embryons bovins produits *in vivo* [Dobrinsky et al., 1995]. Le taxol, la cytochalasine B et son association avec la colchicine ont permis de favoriser la survie de morulas et de jeunes blastocystes après vitrification.

## 4. Dommages osmotiques

Les dommages osmotiques sont liés aux différences de concentrations en cryoprotecteurs entre les milieux intra- et extracellulaire et aux déséquilibres osmotiques qui en résultent [Meryman, 2007; Gao et Zhou, 2012]. Ces différences peuvent survenir lors de deux phases qui doivent donc être correctement appréciées : l'addition des cryoprotecteurs avant le processus de refroidissement et le retrait des cryoprotecteurs pendant et/ou après le processus de réchauffement. En effet, la plupart des cryoprotecteurs utilisés possèdent un

coefficient de perméabilité membranaire inférieur à celui de l'eau [Mullen et Critser, 2007]. Ainsi, lors de l'addition des cryoprotecteurs, leur présence rend hypertonique la solution où sont placés les embryons. Les cellules subissent donc dans un premier temps une contraction du fait de la sortie d'eau intracellulaire avant de ré-augmenter de volume du fait de la pénétration des cryoprotecteurs et de la rentrée concomitante d'eau. A l'inverse, lors du retrait des cryoprotecteurs, les embryons sont placés dans une solution hypotonique du fait de la présence de cryoprotecteurs dans le milieu intracellulaire. Les cellules vont donc tout d'abord gonfler du fait de la rentrée d'eau avant de voir leur volume diminuer du fait de la sortie des cryoprotecteurs et d'une partie de l'eau intracellulaire. Ainsi, les dommages osmotiques sont engendrés par des variations de volume, plus ou moins importantes en fonction de la concentration en cryoprotecteurs [Meryman, 2007]. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la survenue de ces dommages (rupture de la membrane plasmique par éclatement lors de la rentrée d'eau ou au contraire par interaction avec le cytosquelette lors de la sortie d'eau… etc.) [Gao et Zhou, 2012]. Néanmoins, les mécanismes des dommages osmotiques ne sont pas encore clairement compris. L'addition et le retrait des cryoprotecteurs par paliers progressifs permettent de les limiter, voire de les éliminer.

#### 5. Autres dommages

D'autres dommages engendrés par un processus de cryoconservation ont également été rapportés dans la littérature. Tout d'abord, lors d'un refroidissement ou d'un réchauffement trop rapides, des changements de volumes non uniformes peuvent avoir lieu au sein de la solution pendant la transition de phase et être à l'origine de plans de fracture [Kasai et al., 1996]. Lorsque ces plans de fracture passent par un embryon, le stress mécanique engendré peut être à l'origine d'une fracture de l'embryon ou de sa zone pellucide. L'importance de ces fractures peut être diminuée à l'aide d'une vitesse de refroidissement ou de réchauffement limitée lors de la transition de phase. Une autre étude a révélé que le bouton embryonnaire d'embryons cryoconservés était partiellement distordu [Saha et al., 1996]. Les cellules des embryons étaient par ailleurs plus espacées que celles d'embryons non cryoconservés [Saha et al., 1996; Vajta et al., 1997]. Cette observation était associée à une réduction de la taille des desmosomes et des jonctions serrées, ce qui suggère une altération des contacts entre cellules lors d'un processus de cryoconservation. Enfin, un processus de refroidissement peut être à l'origine d'altérations sur les organelles intracellulaire. Lors d'un processus de vitrification, il a en effet été observé une dilatation du réticulum endoplasmique granuleux ainsi qu'une augmentation ou diminution de la taille des mitochondries avec augmentation de leur densité [Vajta et al., 1997; Cuello et al., 2007].

### *C. Les cryoprotecteurs*

Un cryoprotecteur peut être défini comme une molécule dont la mise en contact avec des cellules avant leur cryoconservation permet d'augmenter leur taux de survie après décongélation [Fuller, 2004; Muldrew et al., 2004]. Ce sont des composants primordiaux dans la réussite de protocoles de congélation lente ou de vitrification dans la mesure où ils limitent, voire évitent la formation de glace [Moore et Bonilla, 2006; Pereira et Marques, 2008]. Les cryoprotecteurs peuvent être séparés en deux catégories : les cryoprotecteurs pénétrants qui peuvent traverser la membrane plasmique et s'équilibrer dans le cytoplasme et les cryoprotecteurs non pénétrants qui ne peuvent pas entrer dans le cytoplasme [Muldrew et al., 2004; Pereira et Marques, 2008].

## 1. Les cryoprotecteurs pénétrants

Les cryoprotecteurs pénétrants sont de petites molécules non ioniques qui peuvent traverser facilement la membrane cellulaire et possèdent une grande solubilité dans l'eau à basse température [Muldrew et al., 2004; Pereira et Marques, 2008; Leibo et Pool, 2011]. Ils protègent les cellules lors d'un processus de cryoconservation en limitant la cristallisation et l'effet de solution. Les cryoprotecteurs pénétrants permettent donc de limiter les dommages liés à un protocole de congélation lente, mais protègent moins contre ceux liés à un refroidissement rapide [Muldrew et al., 2004].

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de l'effet protecteur de ces molécules. Concernant la cristallisation, les cryoprotecteurs pénétrants forment des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau et diminuent la température de cristallisation des solutions, ce qui limite la formation de glace [Pereira et Marques, 2008; Leibo et Pool, 2011]. Ils facilitent également la déshydratation du milieu intracellulaire par leur action osmotique et leur aptitude à diminuer la température de cristallisation (augmentation du temps de déshydratation), ce qui limite la cristallisation intracellulaire [Moore et Bonilla, 2006]. Il a enfin été évoqué un possible masquage des sites de nucléation [Fuller, 2004].

Par ailleurs, les cryoprotecteurs pénétrants diminuent les concentrations en sels auxquelles devraient être exposées les cellules à une température négative donnée [Fuller, 2004; Muldrew et al., 2004; Mazur et al., 2008]. Ils réduisent en effet la quantité de glace qui devrait être présente et agissent également comme un second solvant pour les sels. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que cette propriété est colligative, c'est-à-dire qu'elle dépend uniquement du nombre de molécules présentes et non de leur nature. Les cryoprotecteurs pénétrants diminuent donc les dommages dus à l'effet de solution.

Depuis la mise en évidence de l'effet protecteur du glycérol en 1949 [Polge et al., 1949], de nombreux cryoprotecteurs pénétrants ont été découverts : éthylène glycol (EG), diméthyle sulfoxyde (DMSO), propanediol… etc. [Moore et Bonilla, 2006]. Leurs propriétés lors de protocoles de cryoconservation peuvent être extrêmement différentes. L'EG est par exemple un cryoprotecteur pénétrant rapidement dans les cellules [Hotamisligil et al., 1996; Kuleshova et al., 1999]. Il limite donc les risques de chocs osmotiques et bien que son aptitude à former un verre ne soit pas très bonne, sa faible toxicité en fait un des cryoprotecteurs de choix lors de protocoles de vitrification [Liebermann, 2012]. A l'inverse, le DMSO permet facilement la formation de verre mais sa toxicité est plus importante [Moore et Bonilla, 2006]. Ces deux cryoprotecteurs sont donc actuellement couramment associés à concentrations égales dans des solutions de vitrification [Liebermann, 2012]. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que les propriétés des cryoprotecteurs dépendent très fortement de leur structure. Des modifications de leur formule peuvent donc engendrer des modifications importantes de leurs propriétés. Il a ainsi été observé que la substitution au groupe hydroxyle d'un groupe méthoxyle sur des polyols, tels que l'EG ou le glycérol favorisait leur capacité à former un verre stable [Wowk et al., 1999].

Les cryoprotecteurs pénétrants sont considérés comme toxiques, en particulier lorsqu'ils sont présents à forte concentration [Hotamisligil et al., 1996; Moore et Bonilla, 2006]. Cette toxicité dépend du cryoprotecteur, de l'espèce considérée, du type de cellule, de la température et également du temps de contact entre le cryoprotecteur et les cellules [Hotamisligil et al., 1996; Agca et al., 1998; Fuller, 2004; Vajta et Kuwayama, 2006]. Comme dit précédemment, les cryoprotecteurs pénétrants peuvent être responsables d'une désorganisation réversible ou irréversible des microfilaments et microtubules du cytosquelette

[Dobrinsky, 1996]. Des essais ont donc été réalisés afin de diminuer cette toxicité en réduisant le temps de contact avec les cellules ou encore en abaissant la température [Fuller, 2004]. Cependant, la perméabilité des cellules aux cryoprotecteurs pénétrants dépend de la température, de l'espèce et du type d'embryons [Moore et Bonilla, 2006]. Ainsi, plus la température est basse, moins les membranes plasmiques sont perméables [Agca et al., 1998]. Réduire le temps de contact ou abaisser la température diminue donc la pénétration des cryoprotecteurs dans les cellules et leur efficacité. Un équilibre doit donc être trouvé entre toxicité et cryoprotection.

Il est enfin nécessaire de remarquer que cette toxicité ne fait pas consensus. Leibo pense ainsi que ces composés sont non toxiques lors d'expositions limitées (10 à 15 min) à une température inférieure à 25°C [Leibo et Pool, 2011]. Selon lui, la toxicité observée à forte concentration serait en réalité issue des dommages engendrés par le choc osmotique.

## 2. Les cryoprotecteurs non pénétrants

Les cryoprotecteurs non pénétrants sont généralement des molécules solubles dans l'eau, possédant un important coefficient osmotique mais ne pouvant pas traverser la membrane plasmique [Muldrew et al., 2004]. Ils agissent donc sur l'osmolarité du milieu extracellulaire [Moore et Bonilla, 2006]. Il s'agit la plupart du temps de disaccharides tels que le saccharose ou le tréhalose, mais d'autres saccharides ou macromolécules (Ficoll, dextrans) peuvent également être utilisés [Kuleshova et al., 1999; Moore et Bonilla, 2006; Pereira et Marques, 2008]. Les cryoprotecteurs non pénétrants jouent plusieurs rôles dans les solutions de cryoconservation.

Premièrement, leur action sur l'osmolarité du milieu extracellulaire constitue une aide précieuse lors des protocoles de congélation lente. Lors du refroidissement, ils favorisent la déshydratation des cellules avant la cristallisation, ce qui diminue la quantité d'eau que la cellule doit perdre afin de conserver un équilibre osmotique avec le milieu extracellulaire [Kuleshova et al., 1999; Muldrew et al., 2004; Moore et Bonilla, 2006; Pereira et Marques, 2008; Liebermann, 2012]. Cette « pré-déshydratation » permet d'une part de diminuer le temps de contact avec les cryoprotecteurs pénétrants et donc leur toxicité [Liebermann, 2012]. Elle permet d'autre part de limiter l'état de surfusion du cytoplasme et donc la probabilité d'apparition de glace intracellulaire [Muldrew et al., 2004]. Lors du réchauffement, ils jouent au contraire le rôle de tampon osmotique en empêchant une entrée massive d'eau dans les cellules qui pourrait provoquer leur éclatement [Kuleshova et al., 1999; Mazur, 2004; Leibo et Pool, 2011; Liebermann, 2012].

Deuxièmement, les cryoprotecteurs non pénétrants jouent le rôle de stabilisateurs et/ou de protecteurs de la membrane plasmique, des protéines intracellulaires et de la zone pellucide [Hotamisligil et al., 1996; Crowe et al., 2004; Mazur, 2004; Pereira et Marques, 2008]. Cette propriété est conservée en présence de fortes concentrations en cryoprotecteurs pénétrants. Le tréhalose et la proline inhibent ainsi le risque de fusion des membranes lipidiques lors d'un processus de refroidissement [Rudolph et Crowe, 1985]. De même, le tréhalose est capable de stabiliser certaines enzymes à basse température [Xie et Timasheff, 1997].

Troisièmement, les cryoprotecteurs non pénétrants permettent de diminuer la quantité de glace se formant dans une solution ainsi que sa température de fusion. Cette propriété est corrélée à leur concentration et dépend du cryoprotecteur considéré (tréhalose et saccharose sont plus efficaces que glucose et fructose) [Wang et Haymet, 1998].

Enfin, ils peuvent substituer une partie des cryoprotecteurs pénétrants présents dans les solutions de vitrification et donc diminuer leur toxicité. Kuleshova a ainsi observé que la substitution d'EG par des mono-, des di- ou des polysaccharides provoquait une augmentation de la température de transition vitreuse [Kuleshova et al., 1999]. Il est d'ailleurs intéressant de

remarquer que les disaccharides sont actuellement les sucres les plus utilisés dans des solutions de vitrification. Néanmoins, il était observé dans cette étude que les monosaccharides semblaient plus efficaces et étaient plus faciles à solubiliser. A l'inverse la solubilisation des polysaccharides était particulièrement difficile. Les monosaccharides pourraient donc se révéler des cryoprotecteurs non pénétrants intéressants. L'efficacité des polysaccharides a été confirmée dans une seconde étude [Kuleshova et al., 2001]. De très bons résultats ont en effet été obtenus après culture *in vitro* ou transfert d'embryons murins vitrifiés dans des solutions ne contenant que 10% à 25% d'EG et 35% à 50% de dextrans ou de ficoll.

### *D. Les différents protocoles de cryoconservation pour embryons*

Deux grands protocoles de cryoconservation existent : la congélation lente et la vitrification (Figure 3) [Vajta et Kuwayama, 2006]. Ces deux méthodes sont basées sur des principes très différents, mais ont toutes les deux pour but d'empêcher la formation de glace intracellulaire [Campos-Chillon et al., 2006; Vajta et Kuwayama, 2006; Meryman, 2007].

Comme dit précédemment, les différents types cellulaires sont plus ou moins sensibles à une exposition à des températures subphysiologiques et à des vitesses de descente en température importantes. Les embryons de différentes espèces se comportent donc différemment lors d'un protocole de cryoconservation [Saragusty et Arav, 2011]. Le choix d'un protocole de cryoconservation et son application doivent donc être adaptés aux embryons cryoconservés.

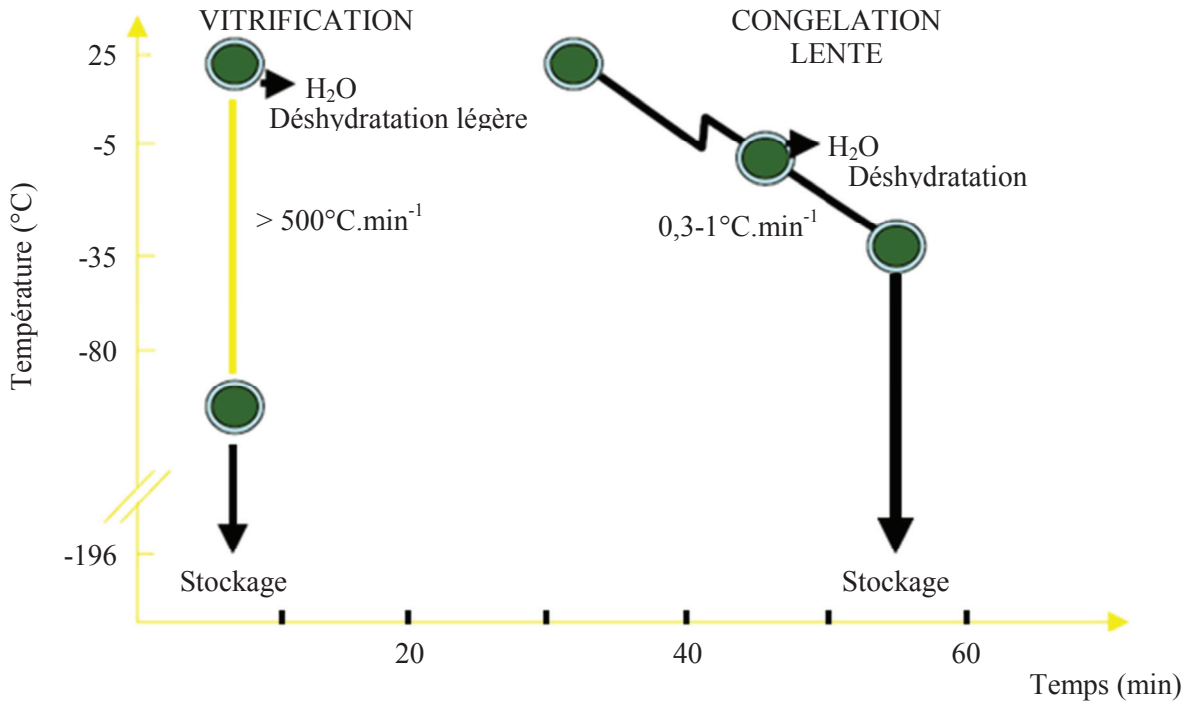



**Figure 3 : Représentation schématique des protocoles de congélation équilibrée et vitrification (d'après [Ménézo, 2004])**

*Lors d'un protocole de vitrification, des vitesses de refroidissement très importantes favorisent la formation d'un verre et empêchent donc l'apparition de glace intracellulaire. A l'inverse, lors d'un protocole de congélation lente, les vitesses de refroidissement appliquées après induction de la cristallisation extracellulaire sont relativement lentes ce qui permet de contrôler la déshydratation cellulaire et d'empêcher ainsi la cristallisation intracellulaire.*

## 1. La congélation lente

Cette méthode de congélation, dite également congélation à l'équilibre, a été la première méthode de cryoconservation développée [Whittingham, 1971; Whittingham et al., 1972]. Elle a également été jusqu'à aujourd'hui la plus utilisée pour la congélation d'embryons [Pereira et Marques, 2008; Saragusty et Arav, 2011; Bielanski, 2012].

La congélation lente est basée sur le principe de déshydratation osmotique [Campos-Chillon et al., 2006; Moore et Bonilla, 2006; Mazur et al., 2008]. Elle consiste à appliquer aux cellules une vitesse de refroidissement lente après induction de la cristallisation extracellulaire de manière à déshydrater progressivement les cellules sans déformation excessive ou effet osmotique important [Vajta et Kuwayama, 2006]. Cette déshydratation contrôlée permet le maintien d'un équilibre entre les potentiels chimiques des milieux intra- et extracellulaire et empêche la formation de glace intracellulaire [Vajta, 2000; Muldrew et al., 2004; Meryman, 2007; Mazur et al., 2008]. La vitesse de refroidissement optimale dépend de trois facteurs principaux qui diffèrent en fonction de chaque type cellulaire : la perméabilité de la membrane cellulaire à l'eau ($L_p$), l'énergie d'activation de cette perméabilité ($E_{lp}$) et le ratio surface/volume des cellules [Muldrew et al., 2004; Mazur et al., 2008]. Elle peut ainsi varier de 1°C.min$^{-1}$ (ovocytes et embryons) à 1000°C.min$^{-1}$ (érythrocytes). Si la vitesse de refroidissement appliquée est supérieure à la vitesse optimale, l'eau intracellulaire surfondue résiduelle peut se transformer en glace intracellulaire [Muldrew et al., 2004; Mazur et al., 2008]. A l'inverse, si la vitesse de refroidissement est trop basse, les cellules subissent des dommages du fait de l'effet de solution. Le succès d'un protocole de congélation lente dépend donc de l'obtention d'un équilibre entre la sortie d'eau de la cellule et sa transformation en glace [Visintin et al., 2002]. La courbe de survie cellulaire lors d'un processus de congélation lente a donc classiquement la forme d'un U inversé (Figure 4 et Figure 5) [Mazur, 2004].

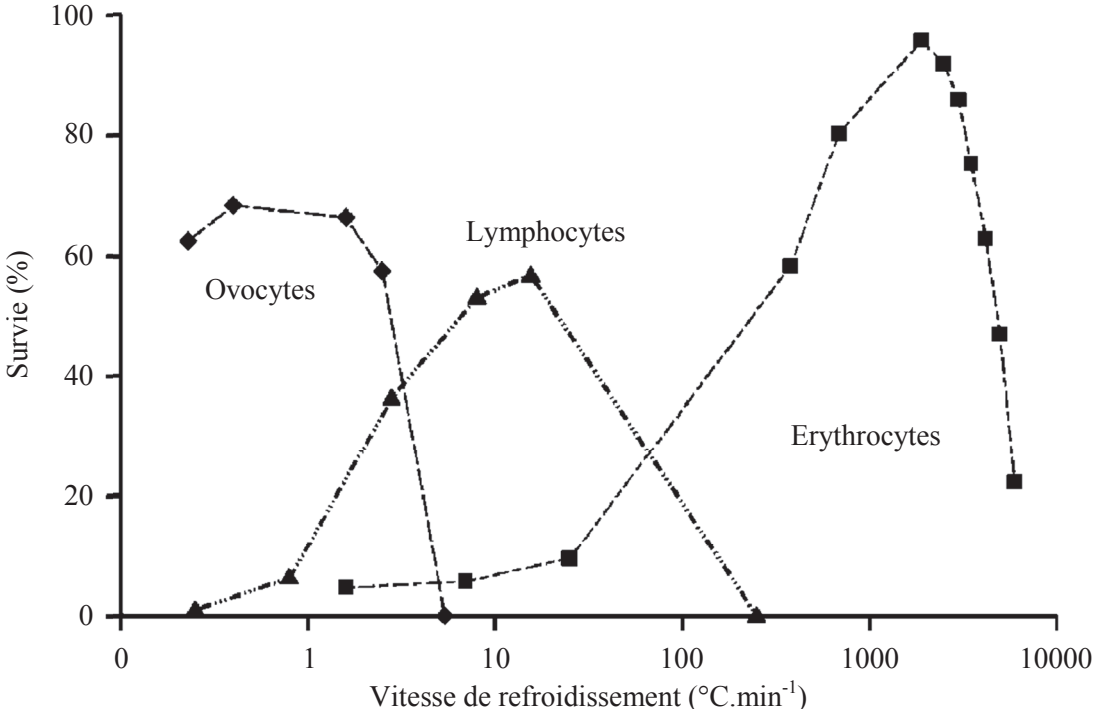



**Figure 4 : Courbes de survie en U inversé en fonction du type de cellules (d'après [Mazur et al., 2008])**

*Lors d'un protocole de congélation lente, les vitesses de refroidissement optimales dépendent du type cellulaire. Ce phénomène est expliqué par les différences de perméabilité membranaire à l'eau et les différences de ratio surface/volume des cellules.*

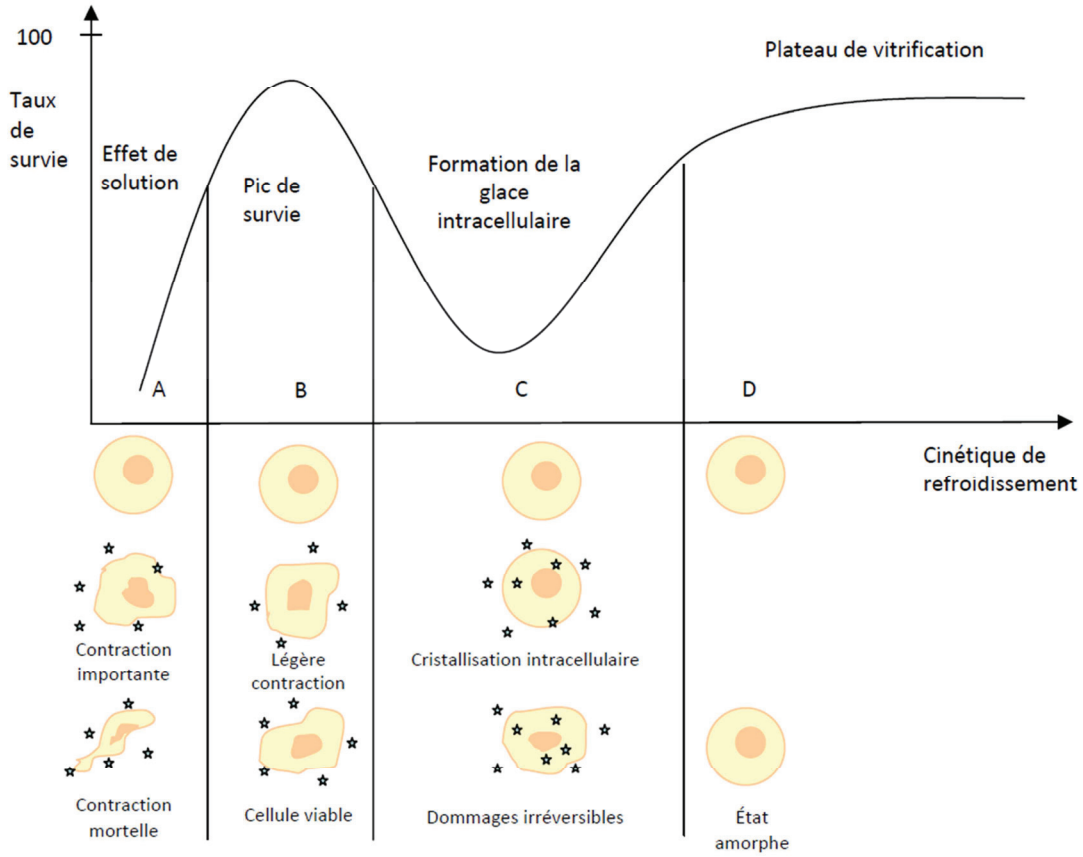



**Figure 5 : Courbe de survie obtenue pour un type cellulaire donné, en présence de cryoprotecteurs et pour un réchauffement rapide [Baudot, 1997]**
*Pour un type cellulaire donné, la courbe de survie en fonction de la vitesse de refroidissement a classiquement la forme d'un U inversé. Lorsque la vitesse est trop faible, la déshydratation est trop importante et aboutit à la mort de la cellule. A l'inverse lorsque la vitesse est trop forte, la déshydratation n'est pas assez importante ce qui aboutit à la formation de glace intracellulaire et donc à la mort cellulaire. Lorsque les vitesses de refroidissement deviennent très importantes, la courbe de survie remonte du fait de la formation d'un état amorphe de l'eau, appelé verre, qui empêche la cristallisation.*

La congélation lente implique l'utilisation de faibles concentrations en cryoprotecteurs (de l'ordre de 1,35 M à 1,5 M pour les cryoprotecteurs pénétrants et de 0,1 M pour les cryoprotecteurs non pénétrants) [Visintin et al., 2002; Saragusty et Arav, 2011]. Les embryons sont tout d'abord placés dans un ou plusieurs bains d'équilibration pendant plusieurs minutes, ce qui permet aux cryoprotecteurs pénétrants de traverser la membrane cytoplasmique. Ils sont ensuite montés dans une paillette et placés dans un congélateur programmable où ils sont refroidis jusqu'à une température comprise entre -5°C et -7°C [Saragusty et Arav, 2011]. Après équilibration, une induction de la cristallisation extracellulaire (étape également appelée « seeding ») est effectuée par application d'un objet froid au contact de la paillette [Visintin et al., 2002; Woods et al., 2004]. Cette étape permet de contrôler la formation de glace extracellulaire et d'éviter ainsi un état de surfusion trop important qui pourrait engendrer une cristallisation trop rapide et donc délétère pour les cellules [Karlsson et Toner, 1996]. La formation de glace extracellulaire provoque alors une augmentation de la concentration extracellulaire en solutés [Leibo et Pool, 2011]. Le potentiel chimique de l'eau extracellulaire devient plus faible que celui de l'eau intracellulaire, ce qui engendre une force motrice qui permet à l'eau intracellulaire de sortir de la cellule [Seki et

Mazur, 2009]. La paillette est ensuite refroidie à une vitesse de 0,3°C.min$^{-1}$ à 0,6°C min$^{-1}$ jusqu'à une température comprise entre -30°C et -40°C [Visintin et al., 2002; Moore et Bonilla, 2006; Saragusty et Arav, 2011]. Cette descente lente permet à l'eau intracellulaire de sortir doucement vers le milieu extracellulaire [Woods et al., 2004; Leibo et Pool, 2011]. Il en résulte une augmentation de la concentration en solutés intracellulaires ainsi qu'en cryoprotecteurs pénétrants qui empêche la formation de glace intracellulaire. Les cellules se déshydratent ainsi progressivement jusqu'à la température à laquelle leur matrice intracellulaire peut vitrifier (Figure 6). Lorsque sont atteints -30°C à -40°C, la paillette est plongée directement dans l'azote liquide pour son stockage.

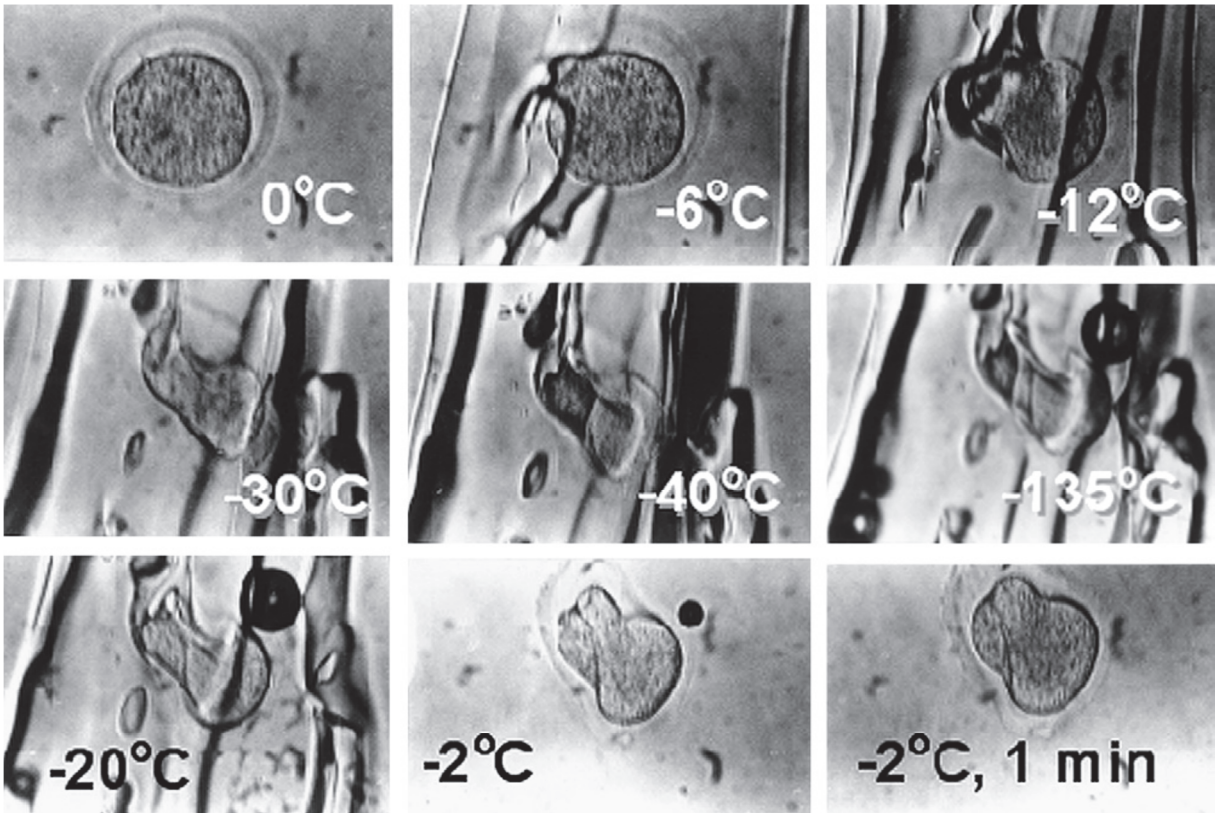



**Figure 6 : Photos d'ovocytes de souris sous cryomicroscopie montrant la déshydratation cellulaire pendant les phases de refroidissement puis de réchauffement d'un processus de congélation lente [Leibo et Pool, 2011]**
*Lors du refroidissement, l'ovocyte se contracte sous l'influence de l'augmentation de la concentration du milieu extracellulaire et donc de la sortie d'eau intracellulaire (effet de solution). Lors du réchauffement, le phénomène inverse se produit.*

Après stockage, la décongélation est effectuée en plaçant la paillette dans l'air ambiant (vitesse de réchauffement inférieure à 196°C.min$^{-1}$) et/ou en la plongeant dans un bain-marie (vitesse de réchauffement supérieure à 4 000°C.min$^{-1}$) [Hochi et al., 1996; Shaw et al., 1997; Liebermann et al., 2002]. Les effets de la vitesse de réchauffement sur la survie des embryons sont relativement complexes et difficiles à interpréter [Mazur, 2004]. En effet des résultats contradictoires ont été obtenus lors de différentes études. Il a ainsi été observé dans certaines études que la survie d'embryons de souris et de rat après congélation n'était pas influencé par la vitesse de réchauffement [Kasai et al., 1982; Rall et Polge, 1984]. A l'inverse, Hochi a observé qu'une décongélation rapide pourrait favoriser la survie des morulas et blastocystes bovins produits *in vitro* [Hochi et al., 1996]. Il semble que le choix d'une vitesse de réchauffement dépende du degré de déshydratation des cellules [Woods et al., 2004]. Lorsque

les cellules sont refroidies jusqu'à -30°C à -40°C avant d'être plongées dans l'azote, de petits cristaux intracellulaires inoffensifs peuvent se former. Un réchauffement rapide est alors nécessaire afin d'éviter la croissance de ces cristaux qui deviendraient alors beaucoup plus vulnérants. A l'inverse, si le refroidissement se poursuit au-delà de -40°C, la déshydratation des cellules est plus importante. Un réchauffement rapide peut alors causer un stress osmotique trop important et les cellules doivent être réchauffées plus lentement.

Bien que la congélation lente soit relativement bien maîtrisée pour beaucoup d'embryons, les résultats obtenus avec des embryons plus sensibles au refroidissement (embryons porcins, de poissons ou d'insectes) sont moins concluants [Mazur et al., 2008]. Les principes fondamentaux qui régissent la cryoconservation équilibrée ne sont pas erronés dans ces espèces, mais ces embryons possèdent une sensibilité accrue à un ou plusieurs facteurs engendrant des lésions lors d'un processus de refroidissement. Parmi ces facteurs, les plus importantes pourraient être les « cold injuries » [Mazur et al., 2008]. En effet, si un embryon est très sensible à ces dommages, une vitesse lente de refroidissement engendre une exposition accrue aux températures critiques, ce qui peut accroître les altérations engendrées. La solution la plus simple pour les limiter a donc été la mise en place de vitesses de refroidissement très importantes de manière à traverser la zone de sensibilité le plus rapidement possible [Vajta et Kuwayama, 2006]. Ceci a conduit au développement d'une méthode de cryoconservation alternative : la vitrification.

## 2. La vitrification

La vitrification a été développée pour la première fois en 1985 sur des embryons de souris par Rall et Fahy [Rall et Fahy, 1985]. Elle est caractérisée par la transformation de l'eau intra- et extracellulaire en un état stable et solide, dit état vitreux, sans formation de cristal [Kuleshova et al., 1999; Vajta, 2000; Vajta et Kuwayama, 2006; Mazur et al., 2008; Liebermann, 2012]. Ce phénomène de vitrification peut être considéré comme une augmentation extrême de la viscosité et se produit aux alentours de -120°C à -130°C [Kuleshova et al., 1999; Moore et Bonilla, 2006; Vajta et Kuwayama, 2006]. Cette température dépend néanmoins de la composition de la solution de vitrification.

Cette méthode de cryoconservation est attractive dans la mesure où elle est moins onéreuse que la congélation lente, plus rapide et nécessite également moins d'équipement lorsqu'elle est appliquée à des cellules isolées [Campos-Chillon et al., 2006; Moore et Bonilla, 2006; Mazur et al., 2008]. Lors d'une procédure classique de vitrification, les embryons sont en effet tout d'abord équilibrés dans une solution contenant 10 à 15% d'un ou plusieurs cryoprotecteurs pénétrants [Leibo et Pool, 2011]. Ils sont ensuite brièvement exposés (entre 30 s et 60 s) à une solution beaucoup plus concentrée en cryoprotecteurs pénétrants (30% à 50%), ce qui engendre une déshydratation substantielle des cellules. Les embryons sont ensuite montés dans un contenant puis plongés directement dans l'azote liquide.

Néanmoins, les concentrations en cryoprotecteurs pénétrants nécessaires sont très importantes, ce qui rend les solutions de vitrification relativement toxiques [Fuller, 2004; Vajta et Kuwayama, 2006]. Il est donc nécessaire de trouver un équilibre entre concentrations en cryoprotecteurs et vitesse de descente en température [Liebermann, 2012]. Différentes méthodes ont été évaluées afin de diminuer la toxicité des solutions de vitrification. Une partie de la toxicité peut ainsi être éliminée en utilisant des combinaisons de cryoprotecteurs (pénétrants et/ou non pénétrants), en diminuant la température d'équilibration (où la toxicité est moindre) ou en remplaçant une partie des cryoprotecteurs pénétrants par des cryoprotecteurs non pénétrants [Kuleshova et al., 2001; Fuller, 2004; Woods et al., 2004; Jin

et al., 2008]. Il demeure néanmoins que la manipulation correcte des échantillons dans des solutions très concentrées en cryoprotecteurs et leur montage dans les contenants sont plus difficiles que lors de protocoles de congélation lente [Saragusty et Arav, 2011].

Quatre facteurs clés sont nécessaires à la réussite des protocoles de vitrification [Yavin et al., 2009; Saragusty et Arav, 2011] :

- Une vitesse de refroidissement importante ;
- Une vitesse de réchauffement importante ;
- Une viscosité de la solution de vitrification importante ;
- Un volume de l'échantillon le plus petit possible.

En premier lieu, la vitesse de descente en température des échantillons doit être élevée (de l'ordre de plusieurs centaines à plusieurs dizaines de milliers de degrés Celsius par minute) [Yavin et al., 2009; Saragusty et Arav, 2011; Bielanski, 2012]. En effet, plus la vitesse de descente en température est importante, plus les concentrations en cryoprotecteurs pénétrants peuvent être diminuées [Vajta et Kuwayama, 2006; Liebermann, 2012]. Des cellules souches embryonnaires murines ont ainsi pu être vitrifiées dans une solution contenant seulement 2 M de propanediol grâce à une vitrification ultrarapide [He et al., 2008]. Il serait même théoriquement possible d'éviter un phénomène de nucléation en l'absence de cryoprotecteurs en appliquant une vitesse de refroidissement suffisamment élevée [Meryman, 2007]. Cette vitesse dépend de trois facteurs : la conductivité thermique du milieu de refroidissement, la nature du contenant et le volume de solution. Les deux derniers facteurs seront abordés dans le dernier paragraphe de cette partie. Lors d'un protocole de vitrification, deux milieux de refroidissement existent : l'azote liquide et la neige d'azote (« nitrogen slush »). Cette dernière consiste en un mélange d'azote liquide et solide dont la température est comprise entre -205°C et -210°C. Il a été montré que la neige d'azote possède un coefficient d'échange (transfert de chaleur par unité de surface) bien supérieur à celui de l'azote liquide [Sansinena et al., 2012]. Son utilisation en remplacement d'azote liquide permet donc d'augmenter fortement les vitesses de refroidissement.

Deuxièmement, la vitesse de réchauffement doit être très importante. Des phénomènes de cristallisation et/ou de recristallisation peuvent en effet intervenir au réchauffement s'il n'est pas suffisamment rapide. Il a été observé dans deux études récentes que la survie d'ovocytes murins était majoritairement liée à la vitesse de réchauffement et non à la vitesse de refroidissement [Seki et Mazur, 2009; Mazur et Seki, 2011]. En effet, plus la vitesse de réchauffement était importante, plus le taux de survie des ovocytes était élevé, et ce, quelle que soit la vitesse de refroidissement. L'explication proposée était que, lors d'un réchauffement lent, de petits cristaux de glace (apparus pendant le refroidissement ou le réchauffement) avaient la possibilité de grandir et ainsi de provoquer des lésions irréversibles aux ovocytes. Un réchauffement rapide limite donc les risques de recristallisation de petits cristaux préexistants [Mazur, 2004; Mazur et al., 2008]. De la même manière, il a été noté dans une autre étude que les taux de survie de morulas murines étaient significativement meilleurs après un réchauffement rapide qu'après un réchauffement lent [Jin et al., 2008]. Il est également important de noter que la vitesse de réchauffement doit être d'autant plus rapide que la vitesse de refroidissement l'est [Mazur et Seki, 2011].

Troisièmement, la viscosité du milieu de vitrification doit être élevée. Cela permet en effet d'augmenter la température de transition vitreuse et de diminuer le taux de nucléation, ce qui limite les risques de cristallisation [Karlsson et Toner, 1996; Kuleshova et al., 2001; Saragusty et Arav, 2011]. La viscosité d'une solution peut être tout d'abord accrue par augmentation de la concentration en cryoprotecteurs [Saragusty et Arav, 2011]. Néanmoins, les cryoprotecteurs pénétrants actuellement connus sont tous toxiques aux concentrations

requises pour limiter, voire éviter la formation de glace [Kuleshova et al., 2001]. L'association de plusieurs cryoprotecteurs pénétrants est donc souvent utilisée de manière à ajouter leurs actions tout en diminuant leur toxicité respective [Saragusty et Arav, 2011]. Par ailleurs, la viscosité d'une solution peut également être augmentée par ajout de macromolécules de haut poids moléculaire [Kuleshova et al., 2001].

Enfin, la diminution du volume de l'échantillon permet d'augmenter le transfert de chaleur [Saragusty et Arav, 2011]. De nombreux dispositifs ont été développés au cours des dix dernières années afin de réduire le volume des échantillons tout en conservant une bonne surface d'échange pour les transferts de chaleurs. Ces dispositifs peuvent être partagés en deux catégories [Saragusty et Arav, 2011] : les dispositifs de surface (cryotop, cryoloop, membranes filtre… etc.) et les dispositifs en tube (paillettes, open pulled straws (OPS), closed pulled straws… etc.). Les dispositifs de surface permettent d'augmenter les vitesses de refroidissement et de réchauffement car ils permettent la mise en contact direct de l'échantillon avec l'azote liquide ou la solution de réchauffement. Néanmoins, cette mise en contact directe peut être une source de contamination pour les embryons vitrifiés. Les dispositifs en tube permettent, quant à eux, d'atteindre des vitesses de refroidissement et de réchauffement élevées tout en restant clos pour la plupart, ce qui les rend plus sûrs du point de vue sanitaire.

---

En conclusion, tous les embryons soumis à un processus de refroidissement subissent des dommages morphologiques et fonctionnels considérables [Vajta et Kuwayama, 2006; Pereira et Marques, 2008]. L'utilisation de cryoprotecteurs et de protocoles de cryoconservation permet de limiter l'apparition de ces dommages et ainsi de favoriser la survie des embryons. Nous nous intéresserons plus particulièrement, dans la suite de ce chapitre, aux différents protocoles utilisés lors de la cryoconservation des embryons de lapins et de bovins produits *in vitro*, modèles utilisés lors de l'étude expérimentale.

Il est par ailleurs intéressant de remarquer que beaucoup d'observations réalisées dans des études biologiques portant sur des protocoles de cryoconservation ont été confirmées par des méthodes d'analyse physique, au premier rang desquelles se trouve la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Cette méthode d'analyse thermodynamique a par exemple corroboré le fait que les vitesses de réchauffement lors de protocoles de vitrification doivent être plus importantes que les vitesses de refroidissement. Nous reviendrons plus en détail sur les nombreux avantages présentés par la DSC pour l'étude de protocoles de cryoconservation dans le deuxième chapitre de la partie bibliographique.

## II. Cryoconservation des embryons de bovins produits *in vitro* et des embryons de lapins

### *A. Cryoconservation des embryons de bovins produits in vitro*

Le transfert d'embryons bovins est actuellement de plus en plus utilisé dans le monde car il est considéré comme moins cher, plus éthique et plus sûr sanitairement que le transport d'animaux [Givens et Marley, 2008]. Entre 1997 et 2010, le nombre d'embryons transférés a ainsi été multiplié par plus de deux [Thibier, 1998; Stroud, 2011]. Cette augmentation est en grande partie liée à l'utilisation de plus en plus importante des embryons produits *in vitro*. Ces derniers présentent en effet de nombreux avantages parmi lesquels une optimisation de la sélection génétique ou encore la création de produits possédant une valeur ajoutée importante grâce au sexage des embryons, à la détection d'allèles spécifiques ou encore à la possibilité de transgénèse [Hansen et Block, 2004; Hansen, 2006]. Néanmoins, force est de constater que cette augmentation concerne essentiellement les embryons produits *in vitro* transférés à l'état frais. Les embryons bovins produits *in vitro* sont en effet plus sensibles aux techniques de conservation par le froid que leurs homologues produits *in vivo* [Leibo et Lostukoff, 1993; Pollard et Leibo, 1993; Vajta et al., 1997; Lazzari et al., 2002].

Bien que les raisons de cette sensibilité ne soient pas encore précisément connues, des différences existent entre ces deux types d'embryons. Après avoir abordé les spécificités des embryons produits *in vitro*, nous nous intéresserons ensuite aux techniques mises en œuvre pour améliorer leur résistance à la cryoconservation. Nous décrirons enfin les différents protocoles de congélation lente et de vitrification utilisés.

#### 1. Particularités des embryons bovins produits *in vitro*

De nombreuses différences morphologiques, métaboliques et génétiques ont été observées entre les embryons produits *in vitro* et ceux développés *in vivo*. Un inventaire exhaustif est donc difficile à réaliser. Nous illustrerons les particularités des embryons produits *in vitro* à partir d'exemples.

##### *a) Différences morphologiques*

D'un point de vue morphologique, il a tout d'abord été observé que le nombre de cellules des embryons bovins produits *in vitro* est supérieur ou inférieur à celui de leurs homologues produits *in vivo* [Thompson, 1997; Lazzari et al., 2002]. Ce nombre dépend des conditions de culture des embryons et donc des différentes publications. Les blastocystes produits *in vitro* possèdent également un bouton embryonnaire moins uniforme avec un nombre plus faible de cellules que les embryons produits *in vivo* [Iwasaki et al., 1990]. Les contacts entre les cellules sont par ailleurs moins étroits, ce qui pourrait être expliqué par un nombre plus faible de jonctions communicantes, de jonctions serrées et de desmosomes [Iwasaki et al., 1990; Boni et al., 1999; Fair et al., 2001]. Enfin, les cellules du trophoblaste présentent des vacuoles et un nombre réduit de microvillosités [Fair et al., 2001].

Au niveau cytoplasmique, il semble que les embryons produits *in vitro* acquièrent un retard dans le développement de certains composants cellulaires [Plante et King, 1994]. Certains organelles telles que les mitochondries ou les lysosomes apparaissent ou réapparaissent plus tardivement que lors du développement d'embryons produits *in vivo*. De plus le volume total des mitochondries est inférieur [Crosier et al., 2000]. Les embryons produits *in vitro* contiennent également beaucoup de lipides intracellulaires [Crosier et al.,

2000; Fair et al., 2001; Gajda et Smorag, 2009]. Leur densité de flottaison est donc inférieure à celle d'embryons produits *in vivo* [Pollard et Leibo, 1993].

### *b) Différences métaboliques*

Les embryons produits *in vitro* possèdent un métabolisme énergétique différent de celui de leurs homologues produits *in vivo* [Khurana et Niemann, 2000]. Lors de l'utilisation de glucose, leur production de lactate est ainsi deux fois supérieure. Cette différence pourrait être une réponse à un stress engendré par des conditions de culture non optimales.

De même que pour les différences morphologiques, les différences de métabolisme sont influencées par le milieu de culture utilisé [Krisher et al., 1999]. La glycolyse est ainsi plus importante chez des embryons cultivés en présence de sérum que chez ceux cultivés dans un milieu chimiquement défini en présence d'alcool polyvinylique (PVA). Il est d'ailleurs intéressant de remarquer, que chez ces derniers, le taux de glycolyse se rapproche de celui d'embryons produits *in vivo*.

### *c) Différences génétiques*

Les embryons produits *in vitro* présentent plus d'anomalies chromosomiques (noyaux avec fragmentation de l'ADN, cellules polyploïdes) que ceux produits *in vivo* [Viuff et al., 1999; Pomar et al., 2005]. Certains blastocystes présentent même des signes sévères de fragmentation de l'ADN dans la majorité des cellules du bouton embryonnaire. De plus, l'expression de certains gènes peut être modifiée après culture *in vitro*. Dans une étude, les gènes codant pour des protéines de stress sont ainsi surexprimés (gènes codant pour la protéine de choc thermique 70 ou pour certaines superoxyde dismutases) [Lazzari et al., 2002]. Cette surexpression est également observée pour des gènes codant pour des transporteurs du glucose. A l'inverse, certaines gènes peuvent être sous exprimés comme le gène codant pour la connexine 43, protéine rentrant dans la composition de jonctions communicantes [Niemann et Wrenzycki, 2000].

Ces différences dans l'expression des gènes dépendent des conditions de culture. Il a ainsi été observé que l'expression de certains gènes (connexine 43, transporteur de glucose ou desmocolline 3) est globalement meilleure dans un milieu chimiquement défini contenant du PVA que dans un milieu contenant du sérum [Wrenzycki et al., 1999]. En particulier, cette amélioration est présente au stade 8-16 cellules qui correspond à l'activation du génome de l'embryon. Seul le gène de la protéine de stress thermique 70 est mieux exprimé dans les embryons cultivés dans le milieu avec sérum, ce qui pourrait être le signe d'un stress engendré par des conditions de culture suboptimales.

## 2. Améliorer la résistance des embryons produits *in vitro* à la cryoconservation

Deux approches existent afin d'améliorer les taux de survie de cellules sensibles à la cryoconservation [Seidel, 2006]. La première consiste à modifier les protocoles de cryoconservation (modification des cryoprotecteurs et de leurs concentrations, modification des temps et des températures d'équilibration… etc.). Cependant, les améliorations engendrées sont souvent limitées. La deuxième approche consiste à modifier les cellules elles-mêmes afin de les rendre moins sensibles.

Parmi les particularités évoquées précédemment, une semble en particulier être responsable de la sensibilité des embryons produits *in vitro* à la cryoconservation : leur forte teneur en lipides intracytoplasmiques. Les embryons contenant beaucoup de lipides

intracellulaires sont en effet plus enclins à subir des « chilling injuries » [Mazur et al., 2008; Saragusty et Arav, 2011]. Nous nous intéresserons donc dans un premier temps à la modification du contenu lipidique des embryons afin d'améliorer leur résistance à la cryoconservation.

Par ailleurs, parmi les nombreuses différences existant entre les embryons produits *in vitro* et ceux produits *in vivo*, plusieurs dépendent fortement de la composition des milieux de culture. L'utilisation de différents milieux de culture peut donc conduire à des cryo-sensibilités différentes [Leibo et Lostukoff, 1993]. Nous évoquerons donc, dans un second temps, les modifications des conditions de culture *in vitro* permettant de diminuer la sensibilité des embryons produits *in vitro*.

### *a) Modifier le contenu lipidique des embryons produits in vitro*

La présence de sérum d'origine animale est considérée comme responsable d'une accumulation excessive de lipides dans le cytoplasme des cellules via une augmentation de la consommation en lipides à partir du milieu ou une altération du métabolisme mitochondrial [Pereira et Marques, 2008]. Les embryons bovins cultivés dans un milieu sans sérum contiennent significativement moins de grandes gouttelettes lipidiques (6 µm) que ceux cultivés dans un milieu avec sérum [Abe et al., 2002]. De même, les morulas obtenues dans un milieu supplémenté de BSA contiennent moins de gouttelettes lipidiques que celles développées dans un milieu avec SVF [George et al., 2008]. Dans les deux études, les embryons cultivés dans le milieu avec sérum étaient plus sensibles à la congélation lente.

Différentes stratégies ont été développées afin limiter la quantité de lipides présente dans les cellules embryonnaires [Pereira et Marques, 2008]. Une première méthode consiste en une polarisation des gouttelettes lipidiques par centrifugation d'embryons bovins au stade une cellule, suivie d'une extraction mécanique par micromanipulation sous microscope. Dans deux études, les taux de survie et de développement *in vitro* après congélation lente d'embryons bovins au stade huit à 16 cellules [Ushijima et al., 1999] ou au stade blastocyste [Diez et al., 2001] étaient significativement supérieurs pour les embryons ayant subi cette délipidation. Néanmoins, cette méthode est invasive, contraignante en temps et manipulations, et n'a pas abouti à des résultats concluants lors de tentatives de transfert embryonnaire [Diez et al., 2001; Pereira et Marques, 2008].

Les embryons peuvent également être manipulés métaboliquement pendant leur culture. Par exemple, l'éthosulfate de phénazine (PES) est un accepteur d'électron qui permet en particulier l'oxydation du NADPH en NADP [Seidel, 2006]. Le NADPH est nécessaire à la synthèse de nombreux lipides et en particulier des acides gras à longue chaine. Le PES permet donc la diminution du contenu lipidique des embryons. Son addition au milieu de culture de blastocystes bovins a permis d'améliorer significativement leur survie après congélation lente et vitrification par rapport à des blastocystes cultivés en présence de SVF [Seidel, 2006].

Outre la présence de lipides intracellulaires, la composition des lipides membranaires contribue également aux différences de sensibilité des embryons produits *in vitro* aux protocoles de cryoconservation [Pereira et al., 2007; Pereira et Marques, 2008]. Lapa s'est ainsi intéressé au profil du contenu lipidique d'embryons bovins cultivés en présence de sérum [Lapa et al., 2005]. Il a observé que les embryons accumulaient préférentiellement des acides gras saturés, ce qui pourrait engendrer une fragilité accrue de leur membrane plasmique et donc expliquer leur sensibilité plus importante à la cryoconservation. Des études ont porté sur la modification de la composition en lipides de cette membrane via

l'incorporation dans le milieu de culture d'acides gras insaturés. L'ajout d'acide linoléique permet ainsi de favoriser la survie de morulas bovines après congélation lente [Hochi et al., 1999]. L'effet bénéfique est lié, non seulement, au moment d'exposition des embryons mais également, en partie, à la durée d'exposition. Cette amélioration serait due à une augmentation de la fluidité de la membrane plasmique et à une action sur la quantité de cholestérol membranaire. Il est néanmoins nécessaire de remarquer que de trop fortes concentrations en acide linoléique sont au contraire délétères pour le développement et la survie des embryons.

Une méthode intermédiaire aux deux méthodes précédentes a également été évaluée. Il s'agit de l'addition d'un isomère conjugué de l'acide linoléïque dans les milieux de culture pour embryons bovins contenant du sérum : l'acide *trans-10*, *cis-12* octadécadienoique. Cet isomère particulier possède la particularité d'être polyinsaturé, mais également de diminuer la quantité de gouttelettes lipidiques présentes dans les cellules embryonnaires après culture en présence de sérum [Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008]. Les taux de survie après congélation lente ou vitrification d'embryons cultivés en présence d'acide *trans-10*, *cis-12* octadécadienoique sont significativement supérieurs à ceux d'embryons cultivés en son absence. De plus, les taux de survie après congélation lente sont également significativement supérieurs aux taux de survie obtenus après culture dans un milieu chimiquement défini (synthetic oviduct fluid (SOF) supplémenté de PVA).

### *b) Autres modifications des milieux de culture*

La présence de cellules dans le milieu de culture semble être un facteur favorisant la résistance des embryons à un processus de vitrification. Cet effet bénéfique a été observé dans deux études utilisant des cellules de la granulosa [Rizos et al., 2001] ou des cellules d'oviducte bovin [Shirazi et al., 2009]. Les cellules permettraient la synthèse de facteurs trophiques pour les embryons et assureraient le retrait de substances délétères pour les embryons (rôle de détoxification).

Une autre étude a porté sur les concentrations en acides aminés présents dans les milieux de culture [Li et al., 2006]. Deux milieux contenant des concentrations identiques à celles présentes dans le fluide de l'oviducte et dans le fluide de l'utérus ont été élaborés. Leur utilisation séquentielle (trois jours de culture dans le premier milieu puis culture dans le second) favorise la survie d'embryons après vitrification. Des concentrations en acides aminés conformes aux besoins des embryons pourraient favoriser leur métabolisme et leur développement.

A l'instar de ce qui a été observé dans la partie précédente, la présence de sérum dans le milieu de culture a des effets délétères sur la survie d'embryons après congélation lente ou vitrification [Cho et al., 2002; Mucci et al., 2006; Gomez et al., 2008]. Bien qu'une altération du contenu lipidique des embryons n'ait pas été mise en évidence, les principales hypothèses avancées sont une augmentation du contenu lipidique des embryons, ou encore la présence d'acides gras saturés dans les sérums de bovins adultes (fragilisation de la membrane plasmique). L'existence de variations entre les lots de SVF est également avancée.

Enfin, différentes études ont porté sur l'ajout de molécules dans les milieux de culture. L'ajout d'acide hyaluronique a ainsi permis une amélioration de la survie des embryons après congélation lente ou vitrification [Lane et al., 2003; Block et al., 2009]. L'acide hyaluronique pourrait réguler l'expression de certains gènes (en particulier de gènes empêchant l'apoptose des cellules ou permettant la synthèse de transporteurs du glucose). De même, l'addition d'hormone de croissance ou de facteurs de croissance, comme l'« epidermal growth factor », favorise la résistance d'embryons à un processus de vitrification [Mtango et al., 2003]. Ces

facteurs et hormones sont en effet fortement impliqués dans le développement des embryons. A l'inverse, l'utilisation d'acide rétinoïque pendant 24 h sur des morulas de 6 j a un effet délétère sur la survie des embryons vitrifiés à 8 j [Gomez et al., 2009]. Cet effet délétère pourrait être dû à une altération de la perméabilité membranaire des cellules du trophoblaste à l'eau ou au sodium.

## 3. Principaux protocoles de cryoconservation utilisés pour les embryons de bovins produits *in vitro*

De très nombreuses études ont porté sur la cryoconservation des embryons de bovins produits *in vitro*. Ces études varient par les protocoles utilisés, mais également par les méthodes de production *in vitro*, l'âge et le stade des embryons cryoconservés. Leurs résultats sont donc très variables et difficilement comparables. Nous essayerons néanmoins dans cette partie de décrire les principaux protocoles utilisés ainsi que leurs résultats.

Il est par ailleurs important de noter que, d'après plusieurs études portant sur les embryons de bovins produits *in vitro*, les blastocystes ou blastocystes expansés de 7 j sont les stades embryonnaires les plus résistants à la cryoconservation. Cette observation a été réalisée lors de protocoles de congélation lente [Hasler et al., 1995; Hasler et al., 1997; Sommerfeld et Niemann, 1999] et de vitrification [Saha et al., 1996; Sommerfeld et Niemann, 1999; Gomez et al., 2009; Rios et al., 2010]. En conséquence ne seront abordés ici que les protocoles ayant eu pour objet la cryoconservation de blastocystes et blastocystes expansés produits *in vitro*.

Lors de l'ensemble de cette partie, la survie *in vitro* des blastocystes après cryoconservation sera définie par leur aptitude à redévelopper leur cavité blastocœlique.

### *a) Principaux protocoles de congélation lente*

Quatre principaux cryoprotecteurs et association de cryoprotecteurs sont utilisés lors de la congélation lente de blastocystes et blastocystes expansés produits *in vitro* (principaux résultats présentés dans le Tableau 1) :

- 10% de glycérol [Hasler et al., 1997; Furnus et al., 1998; Nedambale et al., 2004] ;
- 10% de glycérol associé à 0,1 M ou 0,25 M de saccharose [Diez et al., 2001; Kaidi et al., 2001; Dochi et al., 2008] ;
- 1,5 M d'EG [Hochi et al., 1996; Hasler et al., 1997; Cho et al., 2002; Mucci et al., 2006; Assumpção et al., 2008; Kuzmany et al., 2011; Stinshoff et al., 2011] ;
- 1,5 M d'EG associé à 0,1 M ou 0,25 M de saccharose [Hasler et al., 1997; George et al., 2006; Barcelo-Fimbres et Seidel, 2007; Dochi et al., 2008; Lim et al., 2008].

Un protocole associant 9% de glycérol et 0,2% de tréhalose a récemment été évalué et a permis l'obtention de résultats très intéressants [Guyader-Joly et al., 2011]. Ces derniers sont donc également présentés dans le Tableau 1.

Bien que les protocoles soient relativement différents entre les études, de grandes tendances peuvent être dégagées. Dans la plupart des cas, les embryons sont tout d'abord équilibrés en une seule étape à température ambiante dans la solution de congélation. Ils sont ensuite montés dans une paillette de 0,25 ml puis placés directement dans un congélateur programmable préalablement refroidi à une température comprise entre -5,5°C et -7,5°C (principalement à -7°C). Après induction de la cristallisation, les paillettes sont refroidies à une vitesse comprise entre 0,3°C.min$^{-1}$ et 0,6°C.min$^{-1}$ jusqu'à une température se situant généralement entre -30°C et -35°C. Lors d'une étude, des vitesses variables de refroidissement (de 0,3°C.min$^{-1}$ à 1,5°C.min$^{-1}$) ont été appliquées lors de la congélation de

**Tableau 1 : Résultats de viabilité *in vitro*, d'éclosion *in vitro* et de viabilité *in vivo* après transfert, de blastocystes bovins produits *in vitro* et cryoconservés selon les principaux protocoles de congélation lente**

| | **Taux de survie après culture *in vitro*** | | | **Taux d'éclosion après culture *in vitro*** | | | **Taux de gestation après transfert** (un embryon par receveuse ; DG[b] réalisé entre 70 et 90 j) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **24h** | **48h** | **72h** | **24h** | **48h** | **72h** | |
| **10% glycérol** | 40,0 - 89,9% | 31,0 % | | | 22 % | 35,0 - 77,1% | 30,0 % |
| **10% glycérol + 0,1 – 0,25 M Sac[a]** | 31,3 - 50,7% | 39,8 - 56,2% | 86,0 % | | | 22,4 - 73,0% | 10,5 - 22% |
| **9% glycérol + 0,2 M tréhalose** | | 92,8% | | | | 86,7% | 57,1% |
| **1,5 M EG** | 16,7 - 87,2% | 19,6 - 73,3% | | | 61,1 % | 12,0 - 68,5% | |
| **1,5 M EG + 0,1 - 0,25 M Sac** | 72,4 - 93,0% | 68,3 - 93,0% | | 20,0 - 65,1% | 19,1 - 76,0% | | 24,7 % |

[a] : Saccharose
[b] : Diagnostic de gestation

blastocystes de 7 j [Hochi et al., 1996]. Les meilleurs taux de survie à 48 h et d'éclosion à 72 h ont été obtenus avec la vitesse la plus lente (0,3°C.min$^{-1}$). Il semble donc logique que cette vitesse de refroidissement soit la plus fréquemment utilisée dans les protocoles de congélation lente. Les paillettes sont enfin plongées directement dans l'azote liquide.

### *b) Principaux protocoles de vitrification*

Cinq principaux cryoprotecteurs et associations de cryoprotecteurs sont utilisés lors de la vitrification de blastocystes et blastocystes expansés produits *in vitro* (principaux résultats présentés dans le Tableau 2) :

- 40% d'EG associé ou non à 0,3 ou 0,5 M d'un cryoprotecteur non pénétrant (sucrose, galactose ou tréhalose) [Palasz et al., 1997; Sommerfeld et Niemann, 1999; Pugh et al., 2000; Mtango et al., 2001; Vieira et al., 2007] ;
- 40% d'EG associé à 18% de Ficoll et 0,3 M de saccharose ou 0,5 M de galactose [mahmoudzadeh et al., 1994; Martinez et al., 1997; Vajta et al., 1999; Moreira da Silva et Metelo, 2005; Walker et al., 2006; Barcelo-Fimbres et Seidel, 2007; Assumpção et al., 2008; Block et al., 2009] ;
- 40% d'EG associé à 10% ou 20% de polyvinylpyrrolidone (PVP) et 0,3 M de tréhalose [Saha et al., 1996; Pugh et al., 2000; Mtango et al., 2001; Mtango et al., 2003] ;
- 25% d'EG associé à 25% de glycérol [Martinez et al., 1997; Agca et al., 1998; Kaidi et al., 2001; Martinez et al., 2002; Assumpção et al., 2008; Pereira et al., 2008]
- 20% d'EG associé à 20% de DMSO et associé ou non à 0,5 M de saccharose [Vajta et al., 1999; Rizos et al., 2001; Li et al., 2006; Vieira et al., 2007; Gomez et al., 2008; Gomez et al., 2009; Rios et al., 2010; Stinshoff et al., 2011].

On peut tout d'abord remarquer que l'EG rentre dans la composition de l'ensemble des solutions de vitrification malgré sa faible tendance à former un verre. Sa faible toxicité ainsi que sa grande capacité de diffusion permettent en effet de limiter les chocs osmotiques, ce qui est particulièrement important lors de l'utilisation de fortes concentrations en cryoprotecteur.

Lors d'un protocole de vitrification, les embryons sont tout d'abord placés dans une ou plusieurs solutions d'équilibration. Il a d'ailleurs été observé que multiplier les paliers d'équilibration permettait d'augmenter les taux de survie et d'éclosion après vitrification d'embryons de bovins produits *in vitro* [Mtango et al., 2001]. Ceci pourrait être expliqué par la diminution des effets osmotiques dus à l'addition progressive des cryoprotecteurs. Les embryons sont ensuite équilibrés dans la solution finale de vitrification, montés dans les contenants et plongés directement dans l'azote liquide. Dans la plupart des cas, la vitrification des embryons s'effectue dans des paillettes de 0,25 ml. Néanmoins, le volume de solution à vitrifier dans ce type de paillettes est relativement important. D'autres dispositifs ont donc été évalués afin d'augmenter les vitesses de refroidissement des solutions. Ces dispositifs peuvent être divisés en 2 catégories : les dispositifs en tube et les dispositifs de surface.

Concernant les dispositifs en tube, le plus connu et le plus utilisé est l'OPS, qui a été décrit pour la première fois en 1998 [Vajta et al., 1998; Vajta et al., 1999]. Il s'agit d'une paillette chauffée puis étirée à son extrémité, ce qui permet de diminuer son diamètre de moitié environ et de diminuer le volume de solution à vitrifier. L'OPS a été utilisée dans de nombreuses études sur les embryons de bovins produits *in vitro* [Rizos et al., 2001; Cho et al., 2002; Li et al., 2006; Gomez et al., 2008; Gomez et al., 2009; Shehab-El-Deen et al., 2009; Rios et al., 2010]. Cependant, un inconvénient majeur reste le contact direct entre l'azote liquide et la solution de cryoconservation, contact qui peut engendrer des risques sanitaires.

**Tableau 2 : Résultats de viabilité *in vitro*, d'éclosion *in vitro* et de viabilité *in vivo* après transfert, de blastocystes bovins produits *in vitro* et cryoconservés selon les principaux protocoles de vitrification**

| | Taux de survie après culture *in vitro* | | | Taux d'éclosion après culture *in vitro* | | | Taux de gestation après transfert (nombre d'embryons par receveuse ; date du DG[d]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **24h** | **48h** | **72h** | **24h** | **48h** | **72h** | |
| **40% EG ± 0,3 ou 0,5 M Sac[a], Gal[b] ou Tré[c]** | 40,0 – 84,5% | 19,0 - 81,3% | | 10,0 - 17,0% | 3,0 - 44,0% | 8,6 - 80,2% | 0%* - 50%** (2 ; 30 j) |
| **40% EG ± 18% Ficoll + 0,3 Sac ou 0,5 M Gal** | 17,4 - 69,9% | 64,8 - 85,2% | 96,0% | | 16,0 - 49,5% | 13,3 - 84,0% | 35,2% (1 ; 60 j) |
| **40% EG ± 10 ou 20% PVP + 0,3 Tré** | 67,0% | 63,7 - 95,0% | | | 43,0 - 49,7% | 39,1 - 83,7% | |
| **25% EG + 25% glycérol** | 23,1 - 90,0% | | 72,5 - 78,0% | | | 42,2 - 76,0% | 27%* - 60%** (1 ; 120 j) |
| **20% EG + 20% DMSO ± 0,5 M Sac** | 39,0 - 94,8% | 35,2 - 66,9% | 89,0 - 98,0% | | 15,4 - 63,2% | 18,9 - 84,1% | 19% (1 ; 60 j) |

[a] : Saccharose
[b] : Galactose
[c] : Tréhalose
[d] : Diagnostic de gestation
* : si les embryons ne sont pas sélectionnés après le réchauffement
** : si les embryons sont sélectionnés après le réchauffement

Un dispositif identique mais fermé, le « closed pulled straw » a donc été évalué et a permis l'obtention de résultats similaires à l'OPS [Yu et al., 2010]. D'autres dispositifs en tube, tels que les capillaires [Rios et al., 2010] et micropipettes en verre [Cho et al., 2002; Vieira et al., 2007], ont également été développés. Les micropipettes sont fabriquées sur le même principe que les OPS.

Par ailleurs, comme dit précédemment, d'autres dispositifs, dits dispositifs de surface, ont été utilisés lors de protocoles de vitrification. Concernant les d'embryons de bovins produits *in vitro*, il est possible de citer :

- Le « cryoloop » qui permet de maintenir les embryons au sein d'un film très fin de solution de vitrification (Figure 7) [Lane et al., 1999] ;
- Des membranes filtres sur lesquelles sont déposés les embryons et qui absorbent une partie de la solution de vitrification [Momozawa et Fukuda, 2006] ;
- Les dispositifs de vitrification sur surface solide qui consistent en un cube d'acier entouré d'une feuille d'aluminium [Nedambale et al., 2006]. L'ensemble est partiellement plongé dans de l'azote liquide ce qui abaisse la température du dispositif à -180°C ;
- Les dispositifs appelés « minimum volume cooling » pour lesquels une goutte de solution la plus petite possible est déposée sur la bande en polypropylène d'un « cryotop » [Abdalla et al., 2010].



**Figure 7 : Cryoloop [Lane et al., 1999]**
*Les embryons sont visibles au centre.*

### *B. Cryoconservation des embryons de lapins*

La plupart des protocoles de cryoconservation pour embryons de lapins sont réalisés sur des embryons récoltés entre 55 et 72 h après accouplement. Les embryons cryoconservés sont donc souvent des morulas produites *in vivo*. Deux protocoles principaux sont utilisés pour la cryoconservation des embryons de lapins (principaux résultats présentés dans le Tableau 3) :

- Un protocole de congélation lente basé sur l'utilisation de 1,5 M de DMSO [Techakumphu et Heyman, 1987; Joly et al., 1994; Vicente et Garcia-Ximenez, 1994; Joly et al., 1998; Naik et al., 2005; Salvetti et al., 2007; Salvetti et al., 2007; Joly et al., 2012] ;
- Un protocole de vitrification basé sur l'utilisation de 20% d'EG et 20% de DMSO [Vicente et Garcia-Ximenez, 1996; Vicente et al., 1999; Mehaisen et al., 2006; Moce et al., 2010; Viudes De Castro et al., 2010; Lavara et al., 2011].

Concernant la congélation lente, les embryons sont tout d'abord équilibrés dans trois bains de concentration croissante en DMSO : 0,5 M, 1,0 M puis 1,5 M. Chaque équilibration dure 5 min. Les embryons sont ensuite montés dans une paillette de 0,25 ml avant d'être congelés. Les cinétiques de refroidissement varient fortement d'une étude à l'autre, mais des éléments communs peuvent être trouvés. Le « seeding » est ainsi quasiment toujours effectué à -7°C. Les embryons sont ensuite refroidis jusqu'à une température de -30°C à -35°C à une vitesse de 0,3 ou 0,5°C.min$^{-1}$. Une fois cette température atteinte, certains auteurs plongent directement les paillettes dans l'azote liquide, tandis que d'autres appliquent une dernière période de refroidissement contrôlé avant stockage dans l'azote.

**Tableau 3 : Taux de survie *in vitro* et *in vivo* obtenus lors des principaux protocoles de congélation lente et vitrification pour embryons de lapins**

| | Taux de survie après culture *in vitro* | | Taux de survie *in vivo* après transfert | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Dvpt[a] en blastocystes** | **Dvpt en blastocystes expansés ou éclos** | **Taux de gestation[b]** | **Taux de lapereaux développés[c]** | **Taux de lapereaux viables[d]** |
| **Congélation lente : 1,5 M DMSO** | 73,8 - 84,0% | 55,0 - 65,1% | 80,0 - 100,0% | 39,7 - 52,3% | 19,0 - 55,2% |
| **Vitrification : 20% EG + 20% DMSO** | 64,6% | 34,3 - 67,9% | 78,0 - 100,0% | 34,0 - 60,2% | 38,6 - 60,2% |

[a] : Développement
[b] : Nombre de femelles gravides/nombre de femelles transférées
[c] : Nombre de lapereaux développés/nombre d'embryons transférés
[d] : Nombre de lapereaux viables/nombre d'embryons transférés

Concernant la vitrification, une seule solution est généralement utilisée pour l'étape d'équilibration. Les embryons sont ensuite placés dans la solution de vitrification, montés dans un contenant, puis plongés directement dans l'azote liquide. A l'instar de ce qui est observé chez les bovins, la vitrification des embryons de lapins s'effectue souvent dans des paillettes de 0,25 ml et peu de dispositifs favorisant la vitrification ont été évalués. On peut néanmoins citer les OPS [Naik et al., 2005], une version scellée des OPS [Lopez-Bejar et Lopez-Gatius, 2002] ainsi que l'utilisation de neige d'azote en remplacement d'azote liquide [Papis et al., 2009]. L'ensemble de ces méthodes a permis l'obtention de bons résultats.

Enfin, outre la solution contenant 20% de DMSO et d'EG, d'autres solutions ont été évaluées. Néanmoins, les études sont beaucoup moins nombreuses. De la même manière que chez les bovins, l'EG rentre dans la composition de l'ensemble de ces solutions. Il est souvent associé au DMSO à concentrations équivalentes (15% [Makarevich et al., 2008] ou 25% [Naik et al., 2005]) avec éventuellement présence de sucrose. Des solutions identiques à celles utilisées pour les embryons bovins ont également été testées (40% d'EG [Vicente et Garcia-Ximenez, 1994], 25% d'EG associé à 25% de glycérol [Lopez-Bejar et Lopez-Gatius, 2002] et 40% d'EG associé à 18% de Ficoll et 0,3 M de sucrose [Papis et al., 2005; Makarevich et al., 2008]).

## III. Aspects sanitaires liés à la cryoconservation

Le transfert d'embryons produits *in vivo* ou *in vitro* est considéré comme relativement sûr lorsqu'il est effectué en accord avec les recommandations de l'International Embryo Transfer Society (IETS) [Stringfellow et Givens, 2010]. Néanmoins, des risques sanitaires existent, en particulier lors de la cryoconservation et du stockage des embryons dans l'azote liquide [Bielanski, 2012].

### *A. Survie des microorganismes à basse température et contamination des embryons*

Contrairement aux champignons [Bielanski, 2012], la plupart des virus et bactéries peuvent survivre lors d'un stockage à basses températures, y compris dans l'azote liquide (-196°C) [Tedeschi et De Paoli, 2011]. Les virus non enveloppés ne sont ainsi pas inactivés par une congélation et un réchauffement, même en l'absence de cryoprotecteur [Wallis et Melnick, 1968]. De même, certains virus enveloppés et bactéries peuvent survivre directement dans l'azote liquide. En médecine humaine, une étude a ainsi rapporté une série de transmissions du virus de l'hépatite B via des greffes de moelle osseuse conservée dans l'azote liquide contaminé [Tedder et al., 1995]. Chez les bovins, des embryons ont été contaminés de manière expérimentale à partir d'azote liquide par du Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) et du Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) [Bielanski et al., 2000]. De même, lors d'une étude réalisée dans des centres d'IA ou de recherche en reproduction bovine, 32 bactéries et un champignon ont été identifiés dans des échantillons d'azote liquide prélevés dans les cuves de stockage [Bielanski et al., 2003]. Lors de cette étude, *Stenotrophomonas maltophilia* a été la bactérie la plus fréquemment isolée, ce qui semble particulièrement préoccupant dans la mesure où cette dernière est multi-résistante aux antibiotiques et peut fortement limiter le développement embryonnaire [Stringfellow et al., 1997]. La nécessité d'un refroidissement ultrarapide lors du processus de vitrification a engendré l'apparition de contenants permettant la mise en contact direct des embryons avec l'azote liquide. Ces dispositifs ouverts (membranes filtres, « cryoloops » , OPS … etc.) peuvent donc compromettre la sécurité sanitaire du transfert embryonnaire [Bielanski, 2012].

Par ailleurs, la survie des microorganismes à basse température est favorisée par certains composés présents dans les solutions de cryoconservation. Ainsi, une grande variété de cryoprotecteurs tels que le DMSO, l'EG, le glycérol ou encore le saccharose peuvent être utilisés pour la conservation de microorganismes aux mêmes concentrations que celles utilisées pour la conservation des embryons [Wallis et Melnick, 1968; Hubalek, 2003]. De même, des composés tels que le SVF ou la BSA peuvent jouer le rôle de stabilisateurs [Bielanski, 2012].

L'azote liquide, le matériel utilisé lors de la cryoconservation (paillette, congélateur programmable), ainsi que les différents composés des solutions de cryoconservation peuvent donc représenter des sources de contamination possibles pour les embryons [Bielanski et al., 2000; Bielanski et al., 2003; Bielanski, 2012]. L'utilisation de contenants correctement scellés ainsi que de matériel et de produits stériles permet de fortement limiter le risque de contaminations croisées, en particulier lors des protocoles de congélation lente [Bielanski et al., 2003; Bielanski, 2012]. Ces mesures simples ne peuvent cependant pas s'appliquer aux produits d'origine animale, dont les caractéristiques physico-chimiques ne permettent pas d'appliquer les procédures classiquement utilisées lors de stérilisations.

### *B. Risques sanitaires engendrés par l'utilisation de produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation*

Deux produits d'origine animale sont essentiellement utilisés dans la fabrication des solutions de cryoconservation : le SVF et la BSA. Ces deux produits, de par leur origine bovine, peuvent être contaminés par de nombreux agents pathogènes parmi lesquels des virus, des bactéries, des levures, des champignons, des mollicutes (et en particulier des mycoplasmes), voire des prions [Dussurgel et al., 1994; Jochems et al., 2002; Even et al., 2006]. Actuellement, la principale source de préoccupation est représentée par le SVF [Givens et Marley, 2008]. La BSA est extraite de sérum bovin par diverses méthodes industrielles dont la plupart peuvent inactiver, voire éliminer beaucoup d'agents pathogènes (chauffage à 65-75°C pendant plus de 3h, chromatographie, méthode de Cohn avec précipitation à l'alcool… etc.). Le SVF est issu de sang prélevé sur des fœtus aux abattoirs par ponction intracardiaque aseptique [Jochems et al., 2002; van der Valk et al., 2004; Even et al., 2006]. Les nombreux procédés industriels qui peuvent ensuite lui être appliqués n'ont pas tous pour vocation d'éliminer les germes potentiellement présents et seules les filtrations ou les irradiations aux ultraviolets (UV) et gamma le permettent [PAA, 2012]. L'inactivation par la chaleur en particulier ne permet qu'une inactivation du complément et non une élimination des microorganismes. Ainsi, afin de limiter les risques de contamination, il est conseillé d'utiliser des SVF ayant subi une irradiation gamma [Perry, 2007]. Néanmoins, tous les SVF commerciaux disponibles ne subissent pas d'irradiation et cette dernière n'est pas efficace sur certains microorganismes, en particulier les prions et certains virus [Taylor, 2000; Nims et al., 2011]. Certains SVF contiennent donc des contaminants, au premier rang desquels de nombreux virus bovins, tels que les Para Influenza 3, BVDV, BHV-1, Blue Tongue virus… etc. [Kniazeff et al., 1975; Erickson et al., 1991; Van der valk, 2001; Nims et al., 2011].

En médecine bovine, le BVDV est actuellement la principale source de préoccupation. En premier lieu, ce virus est souvent retrouvé dans les SVF commerciaux [Van der valk, 2001; Perry, 2007]. Cela est dû à sa capacité de traverser le placenta et donc de contaminer un fœtus pendant la gestation [Lindberg, 2003]. Dans une étude de 2011, 33 lots commerciaux de SVF ont été testés par RT-PCR pour la présence de BVDV et se sont tous révélés positifs pour une ou plusieurs espèces [Xia et al., 2011]. Dans deux autres études réalisées à plus grande échelles, du BVDV a été isolé dans 20% à 50% des lots commerciaux de SVF testés [Levings et Wessman, 1991; Bolin et Ridpath, 1998]. Il est de plus nécessaire de remarquer que certains SVF peuvent à la fois contenir du BVDV et des anticorps neutralisants, ce qui peut empêcher l'isolement du virus [Givens et al., 2002]. Seule sa détection par RT-PCR est alors efficace. Des BVDV neutralisés peuvent infecter de manière inconsistante des cultures d'embryons produits *in vitro*. Le risque d'une infection pour des embryons congelés n'est donc pas nul et l'utilisation de SVF testés par RT-PCR est recommandée.

De plus, ce virus est relativement résistant aux protocoles de cryoconservation, qu'il s'agisse de congélation lente ou de vitrification. Bielanski a ainsi observé que des embryons mis au contact du virus avant leur congélation peuvent rester contaminés après décongélation [Bielanski et Lalonde, 2009]. Il est toutefois important de noter que les deux protocoles de cryoconservation permettaient de réduire le nombre d'embryons contaminés. Troisièmement, le BVDV peut être transmis par transfert embryonnaire, ce qui a été montré expérimentalement [Bielanski et al., 2009] et observé à deux reprises sur le terrain depuis 2000 [Lindberg et al., 2000; Drew et al., 2002]. Dans les deux cas de terrain, un SVF contaminé a été fortement suspecté d'être à l'origine de la transmission. Enfin, l'impact économique du BVDV dans un élevage peut être très important, en particulier sur un troupeau naïf [Houe, 2003; Lindberg, 2003]. La diminution des performances de reproduction et de

production laitière, la mortalité ou encore les retards de croissance engendrent des pertes économiques estimées à plusieurs dizaines de millions de dollars dans des pays comme le Danemark ou le Royaume Uni.

En médecine humaine, la principale préoccupation concerne les agents d'encéphalopathie dégénérative transmissible (TDE). Les produits d'origine sanguine sont en effet suspectés de pouvoir transmettre des maladies à prions, et en particulier la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Une étude a ainsi confirmé en 2008 que l'encéphalopathie spongiforme bovine ainsi que la tremblante peuvent être transmises par transfusion sanguine chez le mouton de manière assez importante [Houston et al., 2008]. De même, un cas probable de transmission interhumaine d'une variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob via une transfusion sanguine a été rapporté en 2004 [Llewelyn et al., 2004]. Bien qu'une transmission transplacentaire entre la mère et son fœtus n'ait pas encore pu être établie avec certitude [Johnson, 2005; Wrathall et al., 2008], la présence de prions dans les SVF ne peut être exclue. Cela semble d'autant plus préoccupant que l'inactivation d'agents de TDE est impossible avec les procédés utilisables sur des dérivés sanguins [Taylor, 2000; Bruckner, 2001]. Ils pourraient ainsi se retrouver également dans de la BSA ou les SVF irradiés et/ou filtrés. Le risque de transmission d'agents de TDE par des produits d'origine bovine, bien que faible, ne peut donc pas être considéré comme nul.

### *C. Substituants aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères*

L'utilisation de BSA ou de SVF ayant subi une irradiation gamma semble réduire les risques sanitaires lors de protocoles de cryoconservation. Néanmoins, la pratique la plus sure reste l'utilisation de substituants aux produits d'origine animale [Guérin et al., 1997; Le Tallec et al., 2001]. De nombreux substituants ont été testés dans des solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères. La plupart de ces substituants sont des macromolécules de haut poids moléculaires qui exercerait le rôle de surfactant et de protecteur de la zone pellucide [Joly et al., 1992; Dumoulin et al., 1994; Palasz et al., 1995; Titterington et al., 1995; Hasler, 2010].

#### 1. Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un produit d'origine biologique [Palasz et al., 2000]. Néanmoins, il est utilisé en tant que substituant au SVF ou à la BSA dans la mesure où il s'agit d'un composé chimiquement défini et où il peut être biosynthétisé [Hasler, 2010]. Il s'agit en effet d'un glycosaminoglycane, c'est-à-dire un polymère non ramifié composé d'une répétition d'un diholoside associant de l'acide D-glucuronique et du D-N-acétylglucosamine [Gall, 2010]. Son poids moléculaire varie de 500 000 à 750 000 Da lorsqu'il est utilisé dans des solutions de cryoconservation pour embryons. Il est actuellement utilisé dans une solution de cryoconservation commerciale pour embryon bovin en tant que substituant au SVF ou à la BSA (Syngro® Ethylene Glycol Freeze Plus with Sucrose).

Des résultats *in vitro* probants ont été obtenus avec de l'acide hyaluronique lors de protocoles de congélation lente d'embryons murins, bovins et ovins. Néanmoins, des auteurs ont noté que les embryons étaient plus difficiles à manipuler, flottaient de manière plus importante et collaient plus les uns aux autres dans une solution contenant de l'acide hyaluronique que dans une solution contenant de la BSA [Joly et al., 1992].

Chez la souris, plusieurs études ont porté sur la congélation lente de morulas ou de blastocystes produits *in vivo* dans des solutions contenant du glycérol et 1 $g.l^{-1}$ d'acide hyaluronique en remplacement de 20% de sérum de veau nouveau-né (NBCS) ou de 3 $g.l^{-1}$ et 4 $g.l^{-1}$ de BSA [Palasz et al., 1990; Joly et al., 1992; Palasz et al., 2000]. Dans les trois études, les taux de développement des embryons congelés en blastocystes expansés ou éclos après 24 h ou 48 h de culture *in vitro* étaient similaires.

Chez la vache, Palasz s'est intéressé à la congélation de blastocystes produits *in vivo* ou *in vitro* dans des solutions contenant du glycérol et 1 $g.l^{-1}$ d'acide hyaluronique en remplacement de 3 $g.l^{-1}$ de BSA [Palasz et al., 2000]. De la même manière que pour les souris, aucune différence n'a été notée dans le développement des embryons congelés après 24 h et 48 h de culture *in vitro*.

Enfin, chez le mouton, des morulas compactées et des blastocystes ont été congelés dans des solutions contenant du glycérol et 1 $g.l^{-1}$ d'acide hyaluronique en remplacement de 4 $g.l^{-1}$ de BSA [Joly et al., 1992]. Après 72 h de culture *in vitro*, aucune différence n'était visible dans les taux de développement des embryons en blastocystes expansés ou éclos.

### 2. Alcool polyvinylique

Le PVA est un polymère synthétique hydrosoluble issu de l'hydrolyse partielle ou totale d'acétate de polyvinyle [DeMerlis et Schoneker, 2003]. Son poids moléculaire varie entre 10 000 et 70 000 Da lorsqu'il est utilisé dans des solutions de cryoconservation pour embryons. Le PVA est connu pour inhiber la formation de la glace dans des solutions contenant un cryoprotecteur pénétrant [Wowk et al., 2000; Wang et al., 2009b]. Il peut donc permettre, en plus de jouer le rôle de substituant, de diminuer la concentration en cryoprotecteur présent dans une solution.

Le PVA a été le substituant le plus étudié en remplacement des produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères. Ce substituant a été évalué selon de nombreux protocoles (congélation lente, congélation rapide et vitrification) chez quatre espèces. Les résultats obtenus dans les différentes études ont été plus contrastés que ceux obtenus avec l'acide hyaluronique. Tandis que les résultats obtenus chez la souris et le porc sont bons, ceux obtenus avec des embryons bovins ou ovins sont moins concluants. Par ailleurs, il a été mentionné dans une étude que des embryons collectés et congelés dans une solution contenant du PVA étaient plus difficiles à manipuler que ceux collectés et congelés dans une solution contenant du SVF ou de la BSA [Seidel et al., 1990]. Les raisons étaient identiques à celles évoquées pour l'acide hyaluronique.

Chez la souris, le PVA semble pouvoir remplacer *in vitro* des produits d'origine animale lors de congélations lente ou rapide de morulas produites *in vivo*. Palasz s'est ainsi intéressé à la congélation lente de morulas dans une solutions contenant du glycérol et 0,1% de PVA en remplacement de 20% de NBCS [Palasz et al., 1990]. Les taux de développement en blastocystes expansés ou éclos après 48 h de culture *in vitro* étaient similaires. De la même manière, deux études ont porté sur la congélation rapide de morulas dans des solutions contenant de l'EG, du glycérol ou du propanediol et 0,1% de PVA en remplacement de 5% ou 10% de FCS [Gutierrez et al., 1993; Nowshari et Brem, 2000]. Dans l'étude de 1993, les taux d'embryons ayant une morphologie normale après décongélation étaient similaires, mais le développement des embryons en blastocystes expansés était significativement meilleur après utilisation de PVA. Dans l'étude de 2000, les taux de développement après 72 h en blastocystes expansés ou éclos étaient également similaires. De plus, après transfert, aucune

différence n'a été obtenue concernant le pourcentage de fœtus vivants et le nombre de sites d'implantation.

Chez le porc, une seule étude a porté sur la vitrification de morulas et de blastocystes dans une solution contenant du DMSO, de l'EG, du saccharose et 0,1%, 0,5% ou 1% de PVA en remplacement de 20% de NBCS [Sanchez-Osorio et al., 2010]. A l'instar de ce qui a été observé chez la souris, il n'existait pas de différence entre les taux de survie et d'éclosion après 72 h de culture *in vitro*. On peut également remarquer qu'il n'existait pas non plus de différence lorsqu'aucun composé macromoléculaire n'était utilisé.

A l'inverse, les résultats obtenus avec des embryons bovins sont beaucoup moins concluants, qu'il s'agisse de congélation lente ou de vitrification. Concernant la congélation lente, deux études ont porté sur la congélation de blastocystes et blastocystes expansés [Seidel et al., 1990; Sommerfeld et Niemann, 1999]. Dans l'étude de 1990, les embryons étaient congelés dans des solutions contenant du glycérol et 0,1% ou 0,4% de PVA en remplacement de 10% de SVF ou 4 $g.l^{-1}$ de BSA. Bien qu'aucune différence significative n'ait été notée, les taux de gestation après transfert étaient bien meilleurs avec les solutions contenant des produits d'origine animale. Dans l'étude de 1999, des blastocystes et blastocystes expansés produits *in vitro* étaient congelés dans des solutions contenant de l'EG et 0,1% de PVA en remplacement de 10% de NBCS. Les taux d'éclosions après 72 de culture *in vitro* étaient significativement meilleurs pour les embryons congelés avec du NBCS.

Par ailleurs, deux études ont porté sur la vitrification de blastocystes et blastocystes expansés bovins produits *in vitro*. Vajta les a ainsi vitrifiés dans des solutions contenant de l'EG, du DMSO et 0,3% de PVA en remplacement de 20% de FCS ou 5 $g.l^{-1}$ de BSA [Vajta et al., 1999]. Bien que les taux de ré-expansion après décongélation aient été similaires, les taux d'éclosions étaient significativement meilleurs pour les embryons vitrifiés avec SVF ou BSA. De la même manière, une étude de Sommerfeld a porté sur leur vitrification dans une solution contenant de l'EG et 0,1% de PVA en remplacement de 10% de NBCS [Sommerfeld et Niemann, 1999]. Il n'a pas observé de différence entre les taux d'éclosion des blastocystes de 7 et 8 j et les blastocystes expansés de 8 j. Par contre, les taux d'éclosions étaient significativement meilleurs pour les blastocystes expansés de 7 j congelés en présence de NBCS que pour ceux congelés en présence de PVA.

Enfin, deux études ont porté sur la vitrification d'embryons ovins dans une solution contenant du glycérol, de l'EG et 0,1% de PVA en remplacement de 20% de SVF. Naitana s'est tout d'abord intéressé à la vitrification d'embryons ovins de 4 à 7 j produits *in vivo* [Naitana et al., 1997]. Il n'existait pas de différence concernant les taux de ré-expansion et d'éclosion après culture *in vitro*, ni concernant les taux de gestation après transfert. Léoni a ensuite vitrifié des blastocystes ovins produits *in vitro* [Leoni et al., 2002]. Dans cette étude, les taux de ré-expansion et d'éclosions après 60 h de culture *in vitro* étaient significativement meilleurs pour les embryons vitrifiés en présence de SVF.

### 3. Polyvinylpyrrolidone

La PVP est un homopolymère synthétique non ionique composé d'une répétition de N-vinyl-pyrrolidone [Wang et al., 2003; Szczerba et al., 2010]. Son poids moléculaire varie de 10 000 à 360 000 Da lorsqu'elle est utilisée dans des solutions de cryoconservation pour embryons.

Les études réalisées sur la PVP ont porté sur deux espèces : la souris et les bovins. Et de la même manière que pour le PVA, tandis que les résultats obtenus chez la souris sont

bons, les résultats obtenus chez les bovins sont moins concluants. Il a été montré que la PVP est toxique pour les embryons de souris et les embryons humains [Dumoulin et al., 1994; Kuleshova et al., 2001]. Cela peut sans doute expliquer en partie la variabilité des résultats obtenus dans les études.

Par ailleurs, et pour les mêmes raisons que celles évoquées pour l'acide hyaluronique et le PVA, il a été mentionné dans une étude que des embryons collectés et congelés dans une solution contenant de la PVP étaient beaucoup plus difficiles à manipuler que ceux collectés et congelés dans une solution contenant du SVF ou de la BSA [Seidel et al., 1990]. Cette difficulté a été à l'origine de pertes et de dommages occasionnés aux embryons lors de leur expulsion de la paillette.

Chez la souris, une étude a porté sur la congélation rapide de morulas murines produites *in vivo* dans une solution contenant de l'EG, du glycérol ou du propanediol et 0,1% de PVP en remplacement de 5% de SVF [Gutierrez et al., 1993]. Après décongélation, les taux d'embryons ayant une morphologie normale étaient similaires. De même après 48h de culture *in vitro*, il n'y avait pas de différence concernant les taux de développement en blastocystes expansés. Titterington a vitrifié des embryons de souris de huit cellules produits *in vivo* dans une solution contenant du glycérol et 50% de Percoll en remplacement de 1,125% d'albumine sérique humaine [Titterington et al., 1995]. Le Percoll est une solution contenant 23% de billes de silices entourées d'une couche monomoléculaire de PVP. Cette forme de PVP est connue pour être non toxique. Les taux de développement en blastocystes expansés ou éclos étaient similaires après 48 h de culture *in vitro*. De plus, moins de lésions de la zone pellucide étaient observées après utilisation de Percoll.

Concernant les bovins, une étude a porté sur la congélation lente d'embryons de bovins de 6,5 j à 8 j dans une solution contenant du glycérol et 0,4% de PVP en remplacement de 10% de SVF ou 4 $g.l^{-1}$ de BSA [Seidel et al., 1990]. Les taux de gestation après transfert étaient significativement meilleurs lorsque les embryons étaient congelés en présence de SVF ou de BSA que lorsqu'ils l'étaient en présence de PVP. Néanmoins, de meilleurs résultats ont été obtenus dans une étude plus récente, bien que celle-ci ne compare pas l'utilisation de PVP avec celle d'un produit d'origine animale [Momozawa et Fukuda, 2006]. Cette étude a porté sur la vitrification de blastocystes bovins produits *in vivo* et *in vitro* sur une membrane filtre. Les solutions utilisées contenaient de l'EG, du glycérol, du saccharose et 0,1% de PVP. Vingt embryons produits *in vitro* ont été mis en culture pendant 48 h à 96 h après réchauffement, tandis que trois embryons produits *in vivo* ont été transférés. Après mise en culture, les 20 embryons produits *in vitro* ont éclos. Le transfert des trois embryons produits *in vivo* a permis la naissance d'un veau vivant. Ces résultats mériteraient cependant d'être confirmés étant donné le peu d'embryons utilisés.

### 4. Surfactants

Un seul surfactant a été testé en tant que substituant aux produits d'origine animale. Il s'agit d'un polymère non ionique de polyoxyéthylène et polyoxypropylène, de poids moléculaire 8000 à 9000 Da, et commercialisé sous les noms Pluronic F-68 ou VF-5 [Palasz et al., 1995; Anthony et al., 1996]. Les autres surfactants évalués (en particulier le lauryl sulfate) ont montré une toxicité plus ou moins forte sur les embryons de souris [Palasz et al., 1995].

Deux études ont eu pour objet l'utilisation du Pluronic F-68 dans des solutions de congélation lente pour embryons murins et bovins. Les résultats *in vitro* obtenus ont été relativement contrastés dans les deux espèces.

Chez la souris, Palasz s'est intéressé à la congélation lente de morulas produites *in vivo* dans des solutions contenant du glycérol et 0,3% de VF-5 en remplacement de 15% de sérum de de bouvillon [Palasz et al., 1995]. Il n'a pas observé de différence significative concernant leur développement en blastocystes éclos ou en cours d'éclosion après 72 h de culture *in vitro*. Néanmoins, les résultats obtenus avec le sérum tendaient à être meilleurs. Une étude de Palasz a ensuite porté sur la congélation de morulas murines dans une solution contenant du glycérol et 0,05% de Pluronic F-68 en remplacement de 3 $g.l^{-1}$ de BSA [Palasz et al., 2000]. Les taux de développement étaient similaires après 24 h et 48 h de culture *in vitro*.

Chez les bovins, Palasz s'est également tout d'abord intéressé à la congélation lente d'embryons bovins de 7 j produits *in vivo* dans des solutions contenant du glycérol et 0,3% de VF-5 en remplacement de 15% de sérum de bouvillon [Palasz et al., 1995]. Les taux de développement en blastocystes éclos ou en cours d'éclosions étaient similaires après 72 h de culture *in vitro*. Une seconde étude a porté sur la congélation de blastocystes produits *in vivo* et *in vitro* dans une solution contenant du glycérol et 0,05% de Pluronic F-68 en remplacement de 3 $g.l^{-1}$ de BSA [Palasz et al., 2000]. Après 24 h et 48 h de culture *in vitro*, les taux de développement des embryons produits *in vivo* et *in vitro* étaient significativement moins bons pour ceux congelés en présence de surfactant.

## 5. Dextrans et Ficoll

Les dextrans et le ficoll sont deux polysaccharides. Les dextrans composent une famille de biopolymères ramifiés dont la chaîne principale est composée de D-glucose [Elschner et al., 2012] tandis que le ficoll est un copolymère de saccharose et d'épichlorhydrine, hydrosoluble et très ramifié [Wang et Dubin, 1998]. Leur masse moléculaire peut varier de 64 000 à 90 000 Da et de 70 000 à 400 000 Da respectivement lorsqu'ils sont utilisés dans des solutions de cryoconservation pour embryons. Outre leur rôle de substituant, les dextrans et le ficoll peuvent également être utilisés pour réduire les concentrations en cryoprotecteurs pénétrants [Kuleshova et al., 2001].

Une seule étude a porté sur l'utilisation d'un de ces deux composés en tant que substituant. Cette étude a eu pour objet la congélation rapide de morulas murines produites *in vivo* dans une solution contenant de l'EG, du glycérol ou du propanediol et 0,1% de ficoll en remplacement de 5% de FCS [Gutierrez et al., 1993]. Bien qu'aucune différence significative n'ait pu être observée concernant les taux de développement en blastocystes expansés après 48 h de culture *in vitro*, les meilleurs résultats ont été obtenus après utilisation de ficoll.

Bien qu'aucune comparaison n'ait été effectuée avec des produits d'origine animale, de très bons résultats ont également été obtenus lors de l'utilisation de ficoll et de dextrans dans des solutions de vitrification [Kuleshova et al., 2001]. Kuleshova s'est ainsi intéressée à la vitrification d'embryons de souris de 2, 4 et 8-16 cellules dans des solutions contenant de l'EG et 35% de dextrans ou 35% à 50% de ficoll. Dans une première partie, 91% à 100% des embryons vitrifiés se sont développés en blastocystes expansés après 48 h à 72 h de culture *in vitro*. Dans une seconde partie, le transfert d'embryons de deux cellules a permis l'obtention de fœtus vivants pour 62% à 76% d'entre eux (78% pour le contrôle).

### 6. Peptones végétales

Les peptones d'origine végétale sont des substituants différents de ceux précédemment cités. Elles sont en effet issues de l'hydrolyse puis de la purification d'extraits de plantes [George et al., 2006]. Il en résulte des peptides de quatre à dix acides aminés. En fonction du degré d'hydrolyse, les peptones peuvent fournir des nutriments, des facteurs d'adhésion ou encore des analogues de facteurs de croissance.

Seules deux études ont porté sur l'utilisation des peptones d'origine végétales lors de protocoles de congélation lente et une seule les a comparées aux produits d'origine animale. Dans cette étude, des blastocystes expansés bovins produits *in vitro* ont été congelés dans une solution contenant de l'EG, du saccharose et 1,8 $mg.ml^{-1}$ de peptones en remplacement de 4 $g.l^{-1}$ de BSA [George et al., 2006]. Aucune différence n'a été observée entre les taux de ré-expansion après décongélation, mais les taux d'éclosions étaient meilleurs pour les embryons congelés en présence de peptones. De bons résultats ont également été obtenus dans une seconde étude lors de la congélation lente de blastocystes expansés bovins [George et al., 2008]. Néanmoins, l'objet de cette étude n'était pas l'évaluation de la solution de cryoconservation, ce qui rend l'analyse des résultats délicate.

---

Pour conclure, l'utilisation de produits d'origine animale, et à plus forte raison de SVF, peut être responsable de risques sanitaires, en particulier en espèces bovine (risques de transmission de virus) et humaine (risques de transmission de prions). La pratique la plus sure est donc l'utilisation de substituants aux produits d'origine animale [Guérin et al., 1997; Le Tallec et al., 2001]. Dans ce cadre, de nombreux substituants ont déjà été évalués dans des solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères avec plus ou moins de succès, les meilleurs résultats étant obtenus avec du PVA ou des peptones végétales.

# La calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC est une procédure d'analyse thermodynamique développée au début des années 1960 qui permet la caractérisation des transitions de phase induites thermiquement dans un échantillon [Chiu et Prenner, 2011]. Il s'agit d'une méthode largement utilisée en cryobiologie car l'étude des transitions de phase à basse température peut permettre la caractérisation de solutions de cryoconservation [Kuleshova et al., 2001; Salvetti et al., 2006], l'optimisation de protocoles de cryoconservation [Thirumala et al., 2006; Skyba et al., 2011] ou encore une meilleure compréhension de la formation de glace dans les cellules et organismes vivants [Issartel et al., 2006; Seki et al., 2009]. Deux méthodes de DSC sont actuellement utilisées [Jiang et al., 2002] :

- La DSC par compensation de puissance ;
- La DSC par flux de chaleur.

Le DSC utilisé dans l'approche expérimentale de cette étude était un DSC par compensation de puissance (DSC Diamond, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Nous nous intéresserons donc tout d'abord au fonctionnement de ce type de calorimètre. Nous expliquerons ensuite l'obtention et l'intérêt des grandeurs thermodynamiques choisies pour caractériser les solutions de congélation. Enfin, nous présenterons les principales utilisations de la DSC en cryobiologie, en particulier pour l'étude des protocoles de congélation lente.

## I. Principe de la calorimétrie différentielle à balayage

### *A. Fonctionnement d'un calorimètre différentiel à balayage par compensation de puissance*

Lors d'une étude par DSC, la caractérisation des transitions de phase est réalisée grâce à la mesure des échanges de chaleurs ayant lieu entre l'échantillon et une enceinte adiabatique appelée tête de mesure. Ces mesures sont réalisées lors de refroidissements et de réchauffements à vitesse constante. Dans le cas du DSC – Diamond, cette vitesse peut être programmée de 0,1°C.min$^{-1}$ à 300°C.min$^{-1}$.

La tête de mesure d'un DSC par compensation de puissance est composée de deux fours placés dans une enceinte refroidie en permanence (Figure 8 ; Figure 9). Ce refroidissement est assuré par un radiateur en aluminium placé sous les fours et plongeant dans l'azote liquide. Une homogénéisation du refroidissement des fours est assuré par un flux d'hélium gazeux présent autour de ces derniers. L'hélium est en effet un très bon conducteur thermique.

Sous chacun des fours sont placés d'une part un capteur de température et d'autre part une résistance de chauffe permettant d'adapter la température des fours indépendamment l'un de l'autre. Le principe de la compensation de puissance est de conserver une température égale entre les deux fours, quelles que soient les transitions de phase ayant lieu dans l'échantillon [Clas et al., 1999]. Pour ce faire, l'énergie dégagée ou absorbée par l'échantillon lors de la transition est compensée par ajout ou par soustraction d'une quantité d'énergie équivalente dans la résistance de chauffe placée sous le four de l'échantillon. Dans un calorimètre par compensation de puissance, la variable mesurée est donc la différence de puissance fournie par les deux résistances de chauffe afin de conserver les deux fours à températures égales [Jiang et al., 2002]. Une courbe appelée thermogramme (Figure 10) permet de matérialiser cette différence de puissance en fonction de la température.

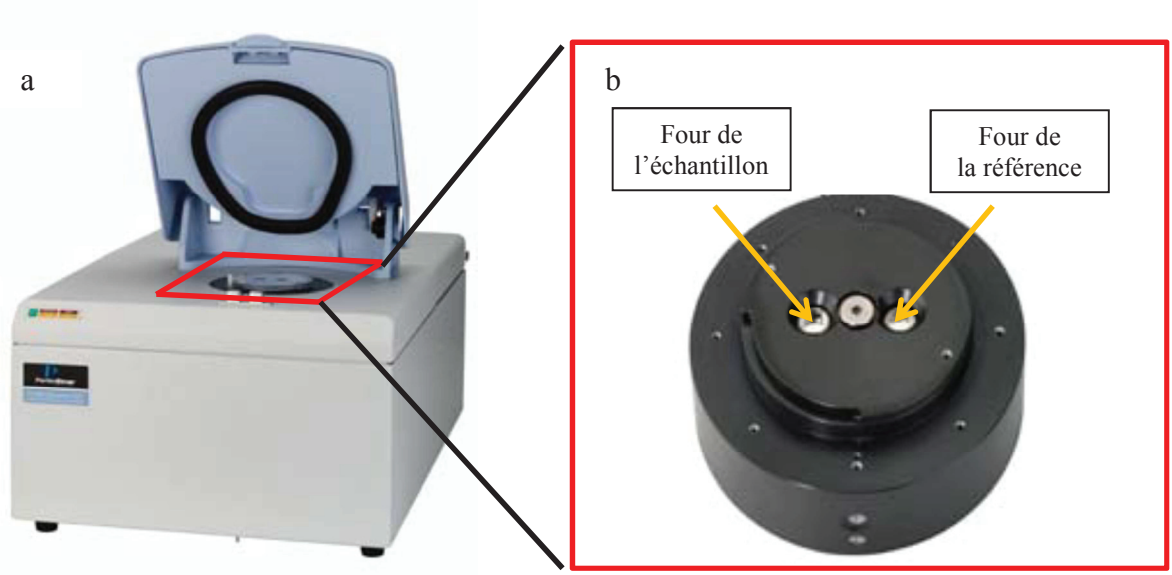



**Figure 8 : Photo du DSC diamond (a) et de la tête de mesure du DSC (b) (manuel d'utilisation du DSC Diamond)**

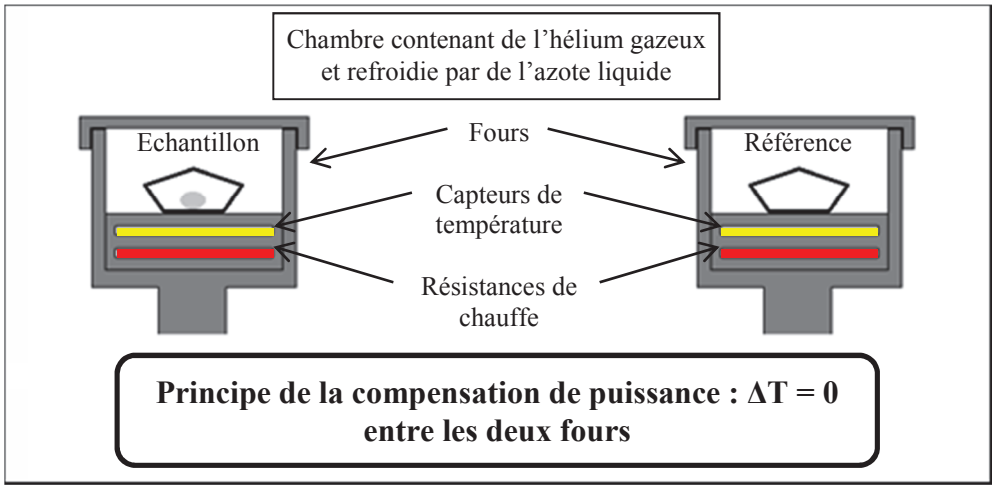



**Figure 9 : Schéma de la tête de mesure d'un DSC par compensation de puissance**
*Le principe de la DSC par compensation de puissance est de conserver une température égale entre les 2 fours, quelles que soient les transitions de phase pouvant affecter l'échantillon. Lorsqu'une transition de phase a lieu au sein de l'échantillon, les résistances présentes sous les fours ne fournissent plus la même puissance de manière à conserver une température égale entre les 2 fours. Cette différence de puissance permet de caractériser la transition.*

### *B. Lecture des thermogrammes lors de la caractérisation de solutions de congélation lente*

Un protocole de congélation lente est caractérisé par la formation et la fonte de glace extracellulaire. La compréhension de ces deux phénomènes revêt donc une importance capitale pour la survie des cellules congelées. De nombreuses grandeurs thermodynamiques sont accessibles lors de l'analyse d'un thermogramme. Parmi celles-ci, trois grandeurs permettent la caractérisation de la formation et de la fusion de la glace :

- La température de cristallisation ($T_c$) et la variation d'enthalpie de cristallisation ($\Delta H$) lors d'un refroidissement ;
- La température de fin de fusion à l'équilibre ($T_m$) lors d'un réchauffement.

## 1. Présentation d'un thermogramme

Les thermogrammes sont des courbes exprimant la différence de puissances fournies par les deux résistances chauffantes en fonction de la température (Figure 10). Cette différence est exprimée en mW.

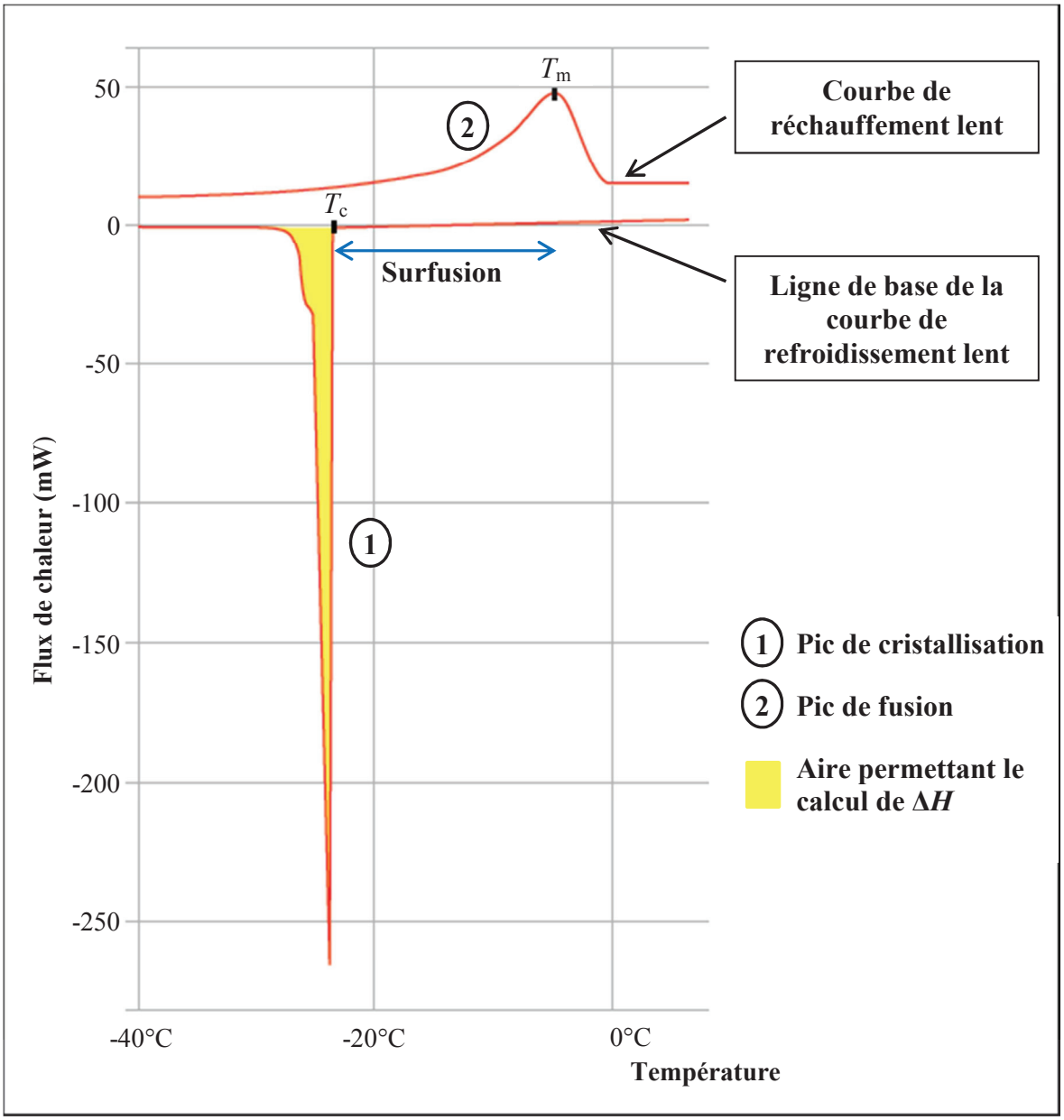



**Figure 10 : Exemple de thermogramme et schéma de son analyse**

*Trois caractéristiques peuvent être mesurées sur un thermogramme après analyse d'une solution de congélation lente :*

- *$T_c$ : la température de cristallisation*
- *$\Delta H$ : l'enthalpie de cristallisation, proportionnelle à la quantité de glace cristallisée*
- *$T_m$ : la température de fin de fusion à l'équilibre, température en dessous de laquelle l'eau peut cristalliser.*

Lorsque l'échantillon ne subit pas de transition de phase, les puissances de chauffe fournies par les deux résistances sont quasiment identiques. Elles ne le sont cependant pas parfaitement du fait de petites variations dans le flux d'hélium gazeux ou de petites différences existant en particulier entre les deux fours, entre les capsules (celle utilisée comme référence et celle contenant l'échantillon) et entre les positions des capsules dans les fours. Ainsi, lorsqu'aucune transition de phase ne se produit, la courbe a la forme d'une ligne quasiment horizontale appelée ligne de base.

Lorsqu'une transition de phase a lieu dans l'échantillon, la puissance de chauffe de la résistance se situant sous le four est modifiée et une différence apparaît entre les puissances fournies par les deux résistances. Une transition de phase est donc matérialisée par l'apparition d'un pic sur le thermogramme. Lorsque la transition de phase est exothermique (cristallisation), la puissance de chauffe fournie par la résistance se situant sous l'échantillon diminue. La différence de puissance entre les deux résistances est négative et le pic est dirigé vers le bas. A l'inverse, lorsque la transition de phase est endothermique (fusion de la glace), la puissance de chauffe fournie par la résistance se situant sous l'échantillon augmente et le pic est dirigé vers le haut.

On peut également remarquer que les transitions de phases sur les thermogrammes ne sont pas isothermes, ce qui est matérialisé par la forme évasé des pics. Ceci est dû à l'aspect dynamique de la mesure. Le DSC impose en effet au système une vitesse constante de refroidissement ou de réchauffement, et la diffusivité thermique de l'échantillon empêche une transition instantanée de l'ensemble de l'échantillon. La transition de phase n'étant pas instantanée, elle ne peut donc pas être isotherme. Le phénomène de cristallisation étant plus brutal que celui de fusion, le pic de cristallisation est beaucoup plus étroit que celui de fusion.

## 2. Grandeurs thermodynamiques utilisées pour la caractérisation de solutions de congélation lente

### *a) Température de cristallisation*

$T_c$ est la température à laquelle débute la cristallisation. Elle est donc mesurée au départ du pic de cristallisation (Figure 10). Contrairement aux deux grandeurs thermodynamiques qui seront décrites par la suite ($\Delta H$ et $T_m$), $T_c$ est très dépendante des conditions expérimentales. Elle correspond en effet à la fin de l'état de surfusion au refroidissement. Les solutions de cryoconservation sont des échantillons de composition complexe. La cristallisation y est donc essentiellement induite par nucléation hétérogène engendrée par des impuretés présentes dans la solution ou au niveau de la paroi des capsules [Meryman, 1966]. La température à laquelle la cristallisation a lieu dépend de la taille des sites de nucléation [Meryman, 2007]. Lorsque les impuretés augmentent de taille, la température de nucléation et donc la valeur de $T_c$ augmentent également. Dans des solutions complexes, $T_c$ est ainsi une grandeur qui peut être très variable.

Dans le cas de la caractérisation de différentes solutions, cette importante variabilité peut rendre difficile la comparaison des valeurs de $T_c$. $T_c$ semble donc moins pertinente que des grandeurs plus stables telles que $\Delta H$ ou $T_m$ lors de telles études. Dans l'approche expérimentale de ce travail, les mesures de $T_c$ ont été prises en compte dans une étude comparative très spécifique concernant une procédure expérimentale très précise (cf. page 75).

### *b) Variation d'enthalpie de cristallisation*

$\Delta H$ correspond à la quantité d'énergie libérée par la formation de glace lors d'un refroidissement lent. Elle est mesurée grâce à l'aire du pic de cristallisation, c'est-à-dire l'aire comprise entre la courbe du pic et la ligne de base (Figure 10). Il s'agit d'une grandeur très intéressante pour la caractérisation des solutions de congélation car elle permet de calculer la chaleur maximale de cristallisation ($Q_{max}$) comme suit :

$$Q_{max}\ (\%) = \Delta H/\Delta H_{eau} \times 100$$

avec $\Delta H_{eau} = 333.0\ J.g^{-1}$. $Q_{max}$ évalue la masse (g) de glace dont la solidification à 0°C aurait libéré la même quantité d'énergie que celle dégagée par 100 g de solution, lors d'un pic de cristallisation correspondant [Baudot et al., 2000]. $Q_{max}$ est donc proche de la quantité de glace cristallisée dans la solution exprimée en pourcentage ($w.w^{-1}$) quand seulement de la glace se forme [Boutron, 1984]. Lors de l'étude d'une solution de congélation lente, $\Delta H$ dépend essentiellement de la composition des solutions. Il est donc possible d'évaluer et de comparer différentes solutions cryoprotectrices en fonction de la quantité de glace cristallisant et ainsi de choisir les compositions les plus adaptées aux protocoles de congélation équilibrée.

### *c) Température de fin de fusion à l'équilibre*

$T_m$ est définie comme la température à laquelle a lieu la fin de la fusion du dernier cristal de glace [Odagescu, 2005]. Elle est classiquement mesurée au sommet du pic de fusion (Figure 10). Dans le cas d'une réaction parfaitement réversible, $T_m$ est équivalente à la température de congélation à l'équilibre, c'est-à-dire la température relevée au début de la formation de glace. $T_m$ est donc la température en dessous de laquelle la cristallisation peut avoir lieu à l'équilibre.

Lors de l'analyse du thermogramme ci-dessus, il est important de remarquer qu'un écart existe entre $T_c$ et $T_m$. Cet écart représente l'état de surfusion de la solution avant le début de la cristallisation. Or la surfusion est un des facteurs les plus importants déterminant la morphologie de la glace extracellulaire [Searles et al., 2001; Gosden et al., 2010]. Ainsi, il a été observé qu'au moment de la cristallisation, plus l'état de surfusion est important, plus la structure de la glace est chaotique et les cristaux sont petits. De même, un état de surfusion important peut précipiter la formation de glace intracellulaire. Il est donc conseillé d'induire la cristallisation extracellulaire juste en dessous de la température de fusion afin d'éviter les problèmes liées à une formation de glace incontrôlée [Karlsson et Toner, 1996]. La caractérisation de $T_m$ lors d'un réchauffement lent prend alors toute son importance.

A l'instar de $\Delta H$, $T_m$ dépend essentiellement de la composition des solutions de congélation lente. Il est donc également possible de comparer différentes solutions en fonction de leur composition.

## II. Utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage en cryobiologie

Les champs d'application de la DSC sont larges dans le domaine de la cryobiologie. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons tout d'abord à son utilisation dans l'étude de protocoles de congélation lente avant d'aborder les autres domaines où elle présente un intérêt. Il est d'ailleurs nécessaire de remarquer que peu d'études ont porté sur la caractérisation de solutions de cryoconservation proprement dite. Nous étendrons donc notre étude à la caractérisation de solutions aqueuses ou salines contenant des cryoprotecteurs.

## *A. Utilisation de la DSC dans l'étude de protocoles de congélation lente*

### 1. Caractérisation de solutions de congélation lente

Comme dit précédemment, peu d'études ont porté sur la caractérisation de solutions de cryoconservation par DSC. Parmi celles-ci, une seule a eu pour objet la caractérisation de solutions de congélation lente [Salvetti et al., 2006]. Lors de cette étude, trois solutions de congélation lente pour sperme de lapins ont été caractérisées afin d'évaluer l'influence des antibiotiques sur leurs propriétés thermodynamiques. Les grandeurs thermodynamiques utilisées étaient $T_c$ et $Q_{max}$. Il a été observé d'une part que les propriétés thermodynamiques des solutions de congélation étaient similaires lorsqu'aucun antibiotique n'était présent. D'autre part, l'addition d'antibiotiques dans les solutions a eu des effets différents en fonction des solutions. Dans deux solutions sur trois, l'addition d'antibiotiques a favorisé la formation de glace (augmentation de $Q_{max}$ et de $T_c$). Dans la troisième solution au contraire, l'addition d'antibiotiques a limité la cristallisation.

Les différences de composition des solutions ont rendu la comparaison et la compréhension des résultats délicates. Il a néanmoins été proposé que les antibiotiques puissent favoriser la nucléation hétérogène et ainsi faciliter la cristallisation. Dans les deux premières solutions, les antibiotiques auraient également pu créer des liaisons avec les cryoprotecteurs, ce qui aurait pu libérer une partie de l'eau liée à ces derniers et donc augmenter la quantité d'eau cristallisée. La troisième solution se différenciait des deux autres par la présence de glycérol. Il serait possible que le glycérol, à l'inverse des autres cryoprotecteurs, établisse des liaisons préférentiellement avec l'eau et non avec les antibiotiques. La quantité d'eau pouvant cristalliser dans cette solution serait ainsi plus faible que dans les deux autres, ce qui expliquerait leurs différences de comportement physique.

Compte tenu de cette hypothèse, l'interaction des antibiotiques avec les cryoprotecteurs a également été évaluée dans cette étude. Cela a été réalisé par élaboration de solutions simplifiées ne contenant que de l'eau distillée et les cryoprotecteurs des solutions précédemment étudiées. Il a tout d'abord été constaté que la diminution de la cristallisation observée lors des premiers résultats était due à l'association de DMSO et de glycérol et non à la présence de glycérol uniquement. Il a également été observé que les antibiotiques avaient tendance à globalement diminuer la cristallisation dans ces solutions, ce qui était contraire aux résultats obtenus avec deux des trois solutions de cryoconservation. Il semble donc que les interactions entre les différents composés d'une solution de cryoconservation soient complexes et jouent un rôle non négligeable dans le comportement thermodynamique des solutions.

Dans une deuxième étude, la DSC a été utilisée afin de mesurer la quantité de glace se formant dans une solution saline contenant 10% de glycérol en fonction de la vitesse de refroidissement [Morris et al., 2006]. Une analyse de la viscosité de la solution (non réalisée par DSC) a tout d'abord été effectuée et a permis de mettre en évidence une diminution de la mobilité des molécules d'eau lors d'un refroidissement entre -7°C et -45°C. Cette diminution était d'autant plus importante que la vitesse de refroidissement était grande. Or, après nucléation de la glace, la croissance des cristaux est réalisée grâce à la diffusion de molécules d'eau depuis la solution jusqu'aux cristaux. Une diminution de cette diffusion devrait donc engendrer une diminution de la croissance des cristaux et donc de la quantité de glace. La DSC a permis de confirmer cette hypothèse. Lorsque la vitesse de refroidissement était comprise entre 1 et 5°C.min$^{-1}$, la quantité de glace se formant dans la solution était de 81% (w.w$^{-1}$). La quantité de glace diminuait ensuite progressivement au fur et à mesure que la

vitesse de refroidissement augmentait pour atteindre 55% à 300°C.min$^{-1}$. Il en a été déduit que, lors d'un refroidissement rapide, la diminution de sortie d'eau intracellulaire était engendrée d'une part par la diminution du temps de déshydratation, mais également par l'augmentation de viscosité de la solution. Cette observation renforce la nécessité d'utiliser des vitesses de refroidissement basses lors d'un protocole de congélation équilibrée afin de permettre une déshydratation cellulaire suffisante.

Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que lors du réchauffement, la quantité de glace fondue était invariablement égale à 81%, quelle que soit la vitesse du refroidissement. Il en a été conclu que lors d'un refroidissement rapide, la possibilité de croissance des cristaux de glace était insuffisante. Il en résultait un phénomène de recristallisation lors du réchauffement dès que l'augmentation de la mobilité des molécules d'eau le permettait.

Enfin, une étude a porté sur la caractérisation de solutions aqueuses contenant différentes concentrations de diéthyle sulfoxyde à l'aide de DSC [Markarian et al., 2004]. Les valeurs de $T_m$ et de $\Delta H$ étaient obtenues lors d'un refroidissement et d'un réchauffement lents à 2°C.min$^{-1}$. Pour des concentrations en diéthyle sulfoxyde compatibles avec un protocole de congélation lente (5%, 10% et 15%), les valeurs de $T_m$ et $\Delta H$ étaient respectivement de -1,0°C, -2,2°C et -3,9°C et de 270,2 J.g$^{-1}$, 231,6 J.g$^{-1}$ et 174,3 J.g$^{-1}$.

## 2. Optimisation de protocoles de congélation lente

Plusieurs travaux réalisés par l'équipe de Devireddy ont porté sur l'optimisation de protocoles de congélation lente à l'aide de DSC. Lors d'un processus de congélation lente, le contrôle de la vitesse de refroidissement après le « seeding » permet à l'eau intracellulaire de sortir progressivement de la cellule et de cristalliser dans le milieu extracellulaire. Cependant, dans le cas d'un refroidissement trop rapide, la sortie d'eau n'est pas suffisante et de la glace intracellulaire se forme. Dans ces études, la vitesse de refroidissement optimale a été définie comme la vitesse maximale de refroidissement d'un milieu ne permettant pas la formation de glace intracellulaire [Devireddy et al., 1999]. Pour un type cellulaire donné, cette vitesse dépend de deux facteurs : la perméabilité membranaire et la probabilité que l'eau intracellulaire restant dans la cellule cristallise. L'optimisation de la vitesse de refroidissement était donc réalisée par mesure de la perméabilité membranaire durant un processus de congélation à l'aide de DSC [Devireddy et al., 1998].

Dans ces travaux, la DSC était utilisée afin d'étudier la cristallisation dans des suspensions cellulaires [Devireddy et al., 1999]. Deux chaleurs dégagées par le milieu étaient mesurées par DSC successivement lors de l'évaluation d'une même suspension cellulaire: *(i)* la chaleur dégagée durant la congélation d'une suspension des cellules vivantes et donc osmotiquement actives (pour lesquelles l'eau intracellulaire est transportée au travers de la membrane puis cristallise dans le milieu extracellulaire) ou *(ii)* la chaleur dégagée durant la congélation d'une suspension des cellules mortes et donc osmotiquement inactives (pour lesquelles l'eau intracellulaire est mixée au milieu extracellulaire du fait de la lyse des membranes). La différence de chaleurs mesurée était ensuite corrélée aux paramètres de perméabilité des cellules osmotiquement actives.

Pour ce faire, sept refroidissements et réchauffements se sont succédé lors des mesures par DSC :

1. Un refroidissement lent (généralement à -5°C.min$^{-1}$) était tout d'abord appliqué jusqu'à apparition de la cristallisation qui était induite grâce à des extraits de *Pseudomonas syringae*. Cette bactérie possède en effet la propriété de déclencher un processus de nucléation de manière assez reproductible [Kleinhans et al., 2006].
2. Un réchauffement lent était effectué jusqu'à la température de changement de phase ($T_{ph}$) qui n'était pas dépassée afin de conserver de la glace extracellulaire. Une isotherme permettait alors la conservation des noyaux de nucléation mais limitait leur croissance en cristaux, ce qui minimisait la contraction osmotique des cellules.
3. Un refroidissement lent à -5°C.min$^{-1}$ ou -20°C min$^{-1}$ jusqu'à -50°C permettait la détermination de la chaleur dégagée lors de la cristallisation du milieu contenant les cellules vivantes et donc osmotiquement actives ($Q_{initiale}$ ; Figure 11).
4. Un réchauffement était appliqué jusqu'à $T_{ph}$
5. Un refroidissement rapide (-200°C.min$^{-1}$) jusqu'à des températures inférieures à -100°C provoquait la lyse des cellules qui devenaient osmotiquement inactives.
6. Un réchauffement était de nouveau appliqué jusqu'à $T_{ph}$
7. Un refroidissement lent à -5°C.min$^{-1}$ ou -20°C min$^{-1}$ jusqu'à -50°C permettait la détermination de la chaleur dégagée lors de la cristallisation du milieu contenant les cellules lysées et donc osmotiquement inactives ($Q_{finale}$ ; Figure 11).

La différence totale entre les chaleurs dégagées lors des refroidissements 3 et 7 ($\Delta Q$ ; Figure 11) était calculée comme suit :

$$\Delta Q \text{ (mW.mg}^{-1}) = Q_{initiale} - Q_{finale}$$

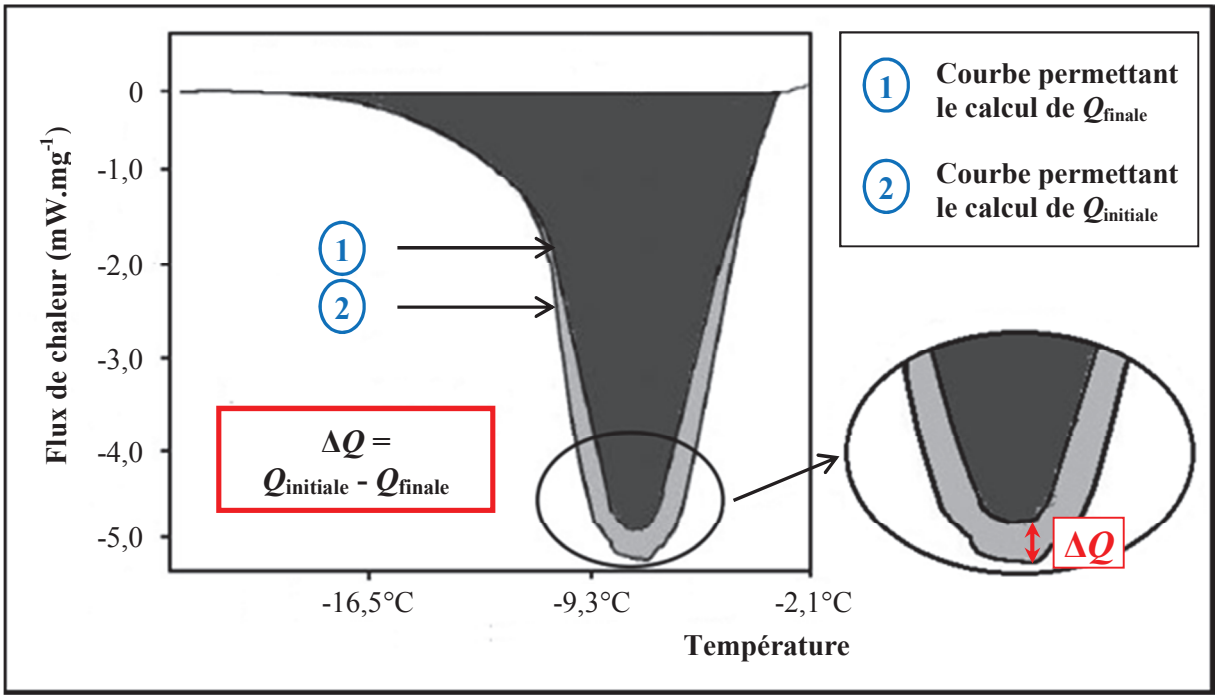



**Figure 11 : Schéma montrant la superposition des thermogrammes permettant l'obtention de $Q_{initiale}$ et $Q_{finale}$ et le calcul de la différence totale de chaleur dégagée ($\Delta Q$) (d'après [Devireddy et al., 2004])**

*$Q_{initiale}$ : chaleur dégagée par la suspension cellulaire lorsque les cellules sont vivantes et donc osmotiquement actives.*

*$Q_{finale}$ : chaleur dégagée par la suspension cellulaire lorsque les cellules sont mortes et donc osmotiquement inactives.*

Une différence partielle entre les chaleurs dégagées depuis $T_{ph}$ jusqu'à une température $T$ ($\Delta Q(T)$) était également calculée pour différentes températures (Figure 12).

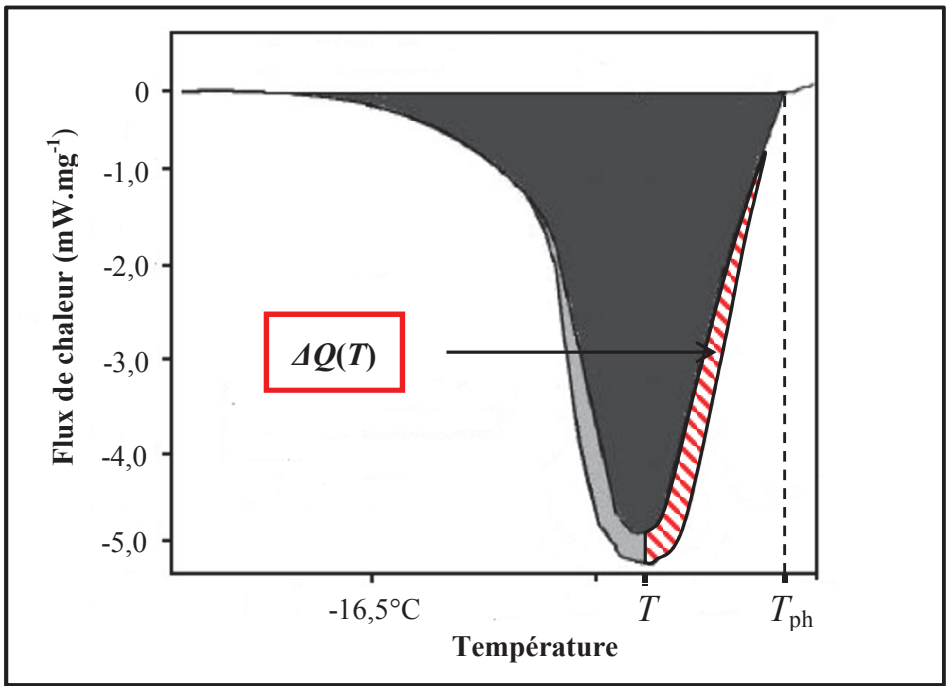



**Figure 12 : Schéma montrant la superposition des thermogrammes permettant l'obtention de $Q_{initiale}$ et $Q_{finale}$ et le calcul de la différence partielle de chaleur dégagée à la température $T$ ($\Delta Q(T)$) (d'après [Devireddy et al., 2004])**
*$\Delta Q(T)$ (en rayures) correspond à la différence de chaleur dégagée entre la température de transition de phase ($T_{ph}$) et une température T.*

$\Delta Q$ et $\Delta Q(T)$ étaient ensuite corrélées au volume des cellules à une température $T$ ($V(T)$) grâce à la formule suivante :

$$V(T) = V_0 - (\Delta Q(T)/\Delta Q) \times (V_0 - V_b)$$

avec $V_0$ le volume initial ou isotonique des cellules et $V_b$ le volume osmotiquement inactif des cellules. Les valeurs de ces deux volumes étaient obtenues grâce à la littérature [Thirumala et al., 2003]. La contraction volumétrique des cellules était alors représentée graphiquement et modélisée grâce à une courbe d'ajustement calculée selon une méthode non linéaire des moindres carrés (Figure 13).

L'équation de cette courbe d'ajustement était déduite du modèle de transport de l'eau de Mazur (modifié pour prendre en compte la présence de cryoprotecteurs) [Karlsson et al., 1994] , ce qui permettait le calcul de la perméabilité de la membrane cellulaire à l'eau ($L_p$) :

$$\frac{dV(T)}{dT} = -\frac{L_p A_c R T}{B v_w} \times \left[ \ln \frac{(V_0 - V_b - n_{cpa} v_{cpa})/v_w}{(V_0 - V_b - n_{cpa} v_{cpa})/v_w + (\varphi_s n_s + n_{cpa})} - \frac{\Delta H_{eau} v_w \rho}{R} \times \left( \frac{1}{T_R} - \frac{1}{T} \right) \right]$$

avec $A_c$ l'aire de la surface membranaire effective pour le transport d'eau, $R$ la constante des gaz parfaits, $B$ la vitesse de refroidissement constante, $v_w$ le volume molaire d'eau, $n_{cpa}$ le nombre de moles de cryoprotecteurs, $v_{cpa}$ le volume molaire des cryoprotecteurs, $\varphi_s$ la constante de dissociation des sels, $n_s$ le nombre d'osmoles en sels, $\Delta H_{eau}$ la chaleur latente de fusion de la glace, $\rho$ la densité de l'eau, et $T_R$ la température de référence (273,15 K).

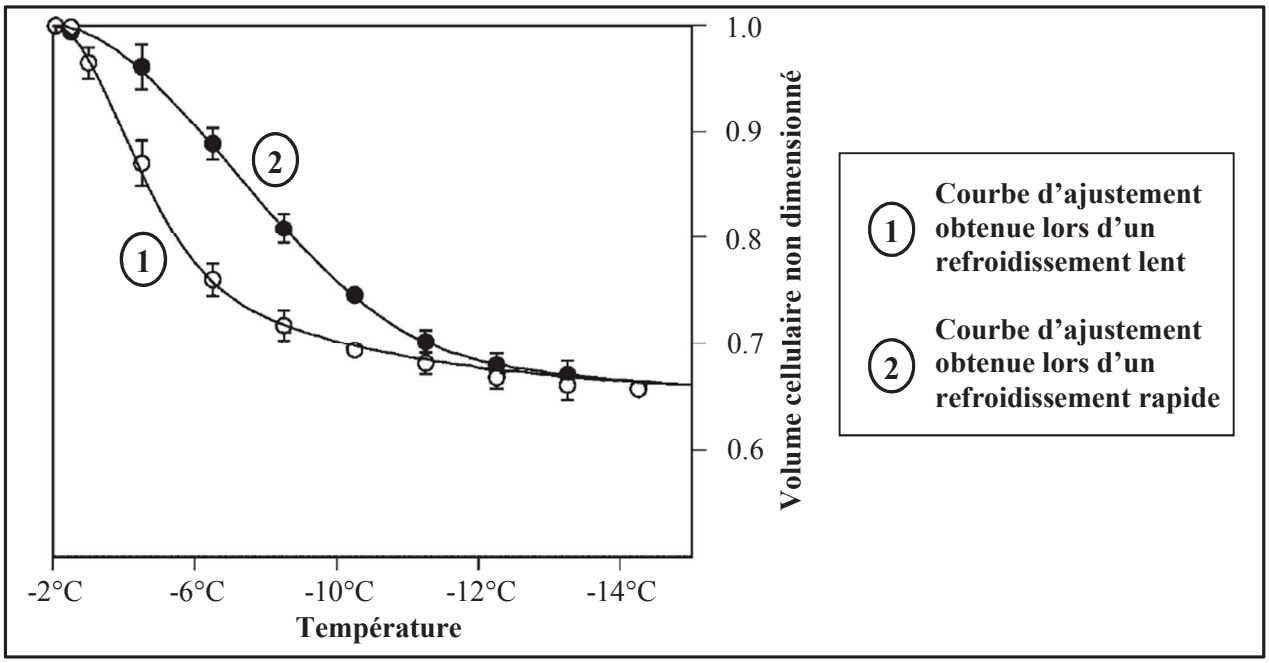



**Figure 13 : Schéma de la contraction volumétrique cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement et courbes d'ajustement (d'après [Devireddy et al., 2004])**
*Pour différentes températures, le volume cellulaire peut être calculé à partir de ΔQ et des ΔQ(T) obtenues pour ces températures. L'équation de la courbe d'ajustement modélisant la contraction volumétrique permet le calcul de la perméabilité membranaire à l'eau.*

$L_p$ était ensuite utilisée afin de calculer la perméabilité de référence de la membrane cellulaire à l'eau à 273,15 K ($L_{pg}$) et son énergie d'activation ($E_{lp}$) :

$$L_p = L_{pg} \exp\left[-\frac{E_{lp}}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R}\right)\right]$$

La substitution de $L_{pg}$ et $E_{lp}$ dans l'équation de transport de l'eau permettait enfin de simuler la quantité d'eau perdue par les cellules en fonction des vitesses de refroidissement. Il en était déduit une vitesse de refroidissement optimale en fonction de la concentration en cryoprotecteurs.

Cette méthode a tout d'abord permis le calcul de vitesses de refroidissement optimales pour la congélation de spermatozoïdes de plusieurs espèces de mammifères (souris [Devireddy et al., 1999], humains [Devireddy et al., 2000], chevaux [Devireddy et al., 2002], chiens [Thirumala et al., 2003] et verrats [Devireddy et al., 2004]) et de poissons [Pinisetty et al., 2005; Thirumala et al., 2005; Devireddy et al., 2006; Thirumala et al., 2006]. Dans la majorité des études, les vitesses optimales calculées étaient proches de celles obtenues de manière empirique dans d'autres travaux. Une seule étude a ainsi montré une discordance [Pinisetty et al., 2005], dont l'origine pourrait être liée à une mauvaise approximation dans le calcul de la probabilité de survenue de la glace intracellulaire (calcul du volume maximal d'eau intracellulaire pouvant rester dans la cellule sans provoquer la survenue de la cristallisation).

Cette méthode a également permis la comparaison des vitesses optimales de refroidissement entre des spermatozoïdes issus d'un éjaculat ou issus de l'épididyme. Il a été observé que les vitesses optimales de refroidissement étaient similaires chez les bovins

[Alapati et al., 2009] et les singes Rhésus [Alapati et al., 2008] pour les deux types de spermatozoïdes. Des protocoles de cryoconservation similaires pourraient donc être utilisés.

Enfin cette méthode a permis la comparaison des vitesses optimales de refroidissement pour la congélation de tissu ovarien. Il a été observé que les vitesses optimales après induction de la cristallisation étaient très dépendantes des vitesses de refroidissement appliquées au-dessus de 4°C pour du tissu ovarien de singe Rhésus [Li et al., 2006] ou de chevaux [Devireddy et al., 2006].

## 3. Elaboration de diagrammes de phase de solutions contenant un cryoprotecteur

Les diagrammes de phase de solutions contenant un cryoprotecteur sont d'une grande importance et d'une grande utilité en cryobiologie [Kleinhans et Mazur, 2007]. Ces diagrammes représentent en effet les différentes valeurs de $T_m$ d'une solution en fonction du pourcentage massique total de solutés présents (cryoprotecteurs et sels). Ils permettent donc de connaître, pour une température négative donnée, le pourcentage de solution cristallisée à l'équilibre ainsi que la concentration en solutés dans la solution non cristallisée. Cette concentration peut ensuite être utilisée afin de calculer la pression osmotique de la solution qui est un des facteurs essentiels pour évaluer la déshydratation des cellules congelées. La méthode actuelle la plus utilisée pour déterminer les valeurs de $T_m$ est la DSC [Kleinhans et Mazur, 2007]. Cette technique se révèle donc encore une fois être une aide précieuse pour la compréhension des protocoles de congélation lente.

Les diagrammes de phase les plus utiles en cryobiologie sont ceux se rapportant à des solutions salines physiologiques contenant un ou plusieurs cryoprotecteurs [Kleinhans et Mazur, 2007; Han et al., 2010; Weng et al., 2011]. }. Ces diagrammes représentent classiquement $T_m$ en fonction du pourcentage massique total de solutés présents et pour un ratio $\frac{masse\ de\ cryoprotecteur}{masse\ de\ NaCl}$ donné. Néanmoins, déterminer le diagramme de phase d'une solution contenant plusieurs solutés est coûteux, laborieux et chronophage. Il faut en effet définir pour chaque concentration de solutés les valeurs de $T_m$. Ainsi, un diagramme de phase d'un système tertiaire contenant de l'eau, du NaCl et un cryoprotecteur pénétrant (diagramme de phase ternaire) nécessite la préparation de plusieurs centaines d'échantillons [Han et al., 2010]. Le problème est bien entendu encore plus important lorsque les solutions salines contiennent deux cryoprotecteurs (diagramme de phase quaternaire). Plusieurs méthodes ont donc été récemment développées afin de déterminer des diagrammes de phase ternaires ou quaternaires à partir de diagrammes de phase binaires (eau + cryoprotecteur ou eau + NaCl), beaucoup plus simples à déterminer. Elles font appel à des équations complexes (somme directe d'équations polynomiales cubiques [Kleinhans et Mazur, 2007] ou équations osmotiques du viriel [Prickett et al., 2011]) qui ne seront pas développées ici.

Ces différentes méthodes ont permis l'obtention des diagrammes de phase ternaires de solutions salines contenant du DMSO, du glycérol, du sucrose, de l'EG ou du propylène glycol [Kleinhans et Mazur, 2007; Benson et al., 2010; Prickett et al., 2011; Weng et al., 2011]. Les valeurs issues des diagrammes ainsi déterminés correspondaient relativement bien aux valeurs issues de la littérature et obtenues par DSC (Figure 14).

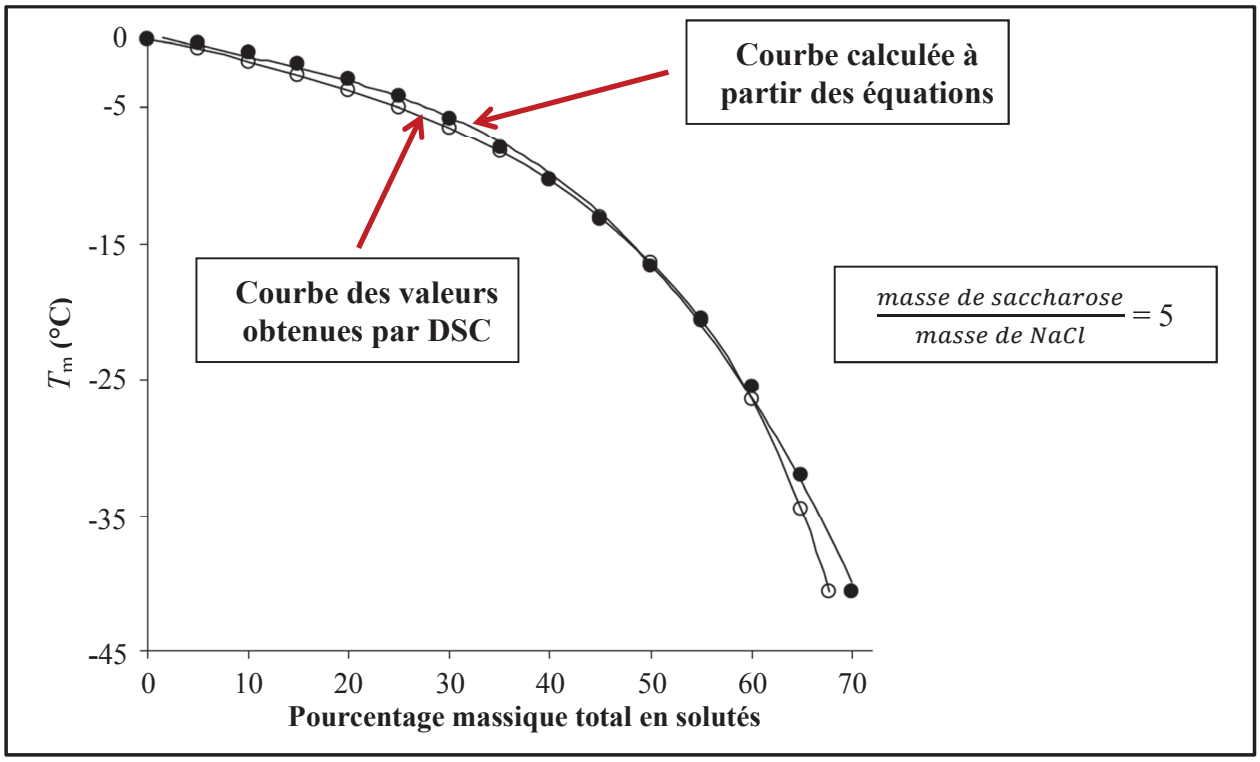



**Figure 14 : Diagramme de phase partiel pour le système eau, NaCl, saccharose (d'après [Kleinhans et Mazur, 2007])**
*Des méthodes mathématiques ont été développées afin de déterminer des diagrammes de phase ternaires ou quaternaires à partir de diagrammes de phase binaires, plus simples à obtenir. La correspondance entre les diagrammes obtenus expérimentalement et ceux obtenus avec ces méthodes permet de valider ces dernières.*

Le diagramme de phase quaternaire du système eau, NaCl, EG et sucrose a ainsi été déterminé en comparant les deux types d'équations évoquées ci-dessus [Han et al., 2010]. Il a été observé que la méthode basée sur la somme d'équations polynomiales semblait plus précise pour la détermination de ce diagramme que celle basée sur les équations osmotiques du viriel.

## *B. Autres utilisations de la DSC en cryobiologie*

### 1. Utilisation de la DSC dans l'étude de protocoles de vitrification

Les études portant sur l'évaluation de solutions ou de protocoles de vitrification sont plus nombreuses que leurs homologues portant sur la congélation lente. La DSC permet en effet d'obtenir, pour une solution donnée, la température de transition vitreuse ainsi que les vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement au-delà desquelles la formation de glace est évitée [Baudot, 1997]. La DSC permet donc d'évaluer la tendance d'une solution à former un verre ainsi que la stabilité de son état amorphe.

Ainsi, trois études ont rapporté l'utilisation de la DSC pour appréhender les paramètres physiques de solutions de vitrification qui étaient ensuite utilisées pour la cryoconservation d'embryons porcins produits *in vitro* [Men et al., 2011], d'ovocytes murins [Seki et Mazur, 2009] ou d'ovaires de brebis [Baudot et al., 2007].

Dans les deux premières études, la DSC était utilisée afin de vérifier certaines vitesses de refroidissement au-delà desquelles la solution seule vitrifiait. Néanmoins, la vitesse critique de refroidissement n'était pas calculée.

Dans la troisième, les vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement ont été calculées pour la solution de vitrification [Baudot et al., 2007]. De plus, les propriétés physiques de morceaux d'ovaires imprégnés par cette solution ont également été évaluées de manière à connaître l'évolution des vitesses critiques lors de l'imprégnation du tissu ovarien. La vitesse critique de refroidissement passait ainsi de 12°C.min$^{-1}$ pour la solution de vitrification seule contre 123°C.min$^{-1}$ pour des vaisseaux sanguins ovariens imprégnés et 340°C.min$^{-1}$ pour du cortex ovarien imprégné. Cette étude a révélé l'importance d'évaluer les solutions de vitrification en présence des cellules ou tissus à vitrifier car les propriétés physiques de tissus imprégnés peuvent être relativement différentes de celles de la solution seule. Ceci est en particulier vrai si l'imprégnation des tissus en solution cryoprotectrice n'est pas suffisante.

Des études plus nombreuses ont porté sur la caractérisation de solutions aqueuses ou salines contenant des cryoprotecteurs dans le but d'évaluer leur tendance à former un verre.

Plusieurs études ont ainsi porté sur le calcul des vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement de solutions aqueuses comportant entre 35% et 60% de cryoprotecteurs (diéthyle formamide et diméthyle formamide [Baudot et Boutron, 1998], propylène glycol et glycérol [Wowk et al., 1999], DMSO [Baudot et al., 2000], alcools aminés [Baudot et al., 2002], EG [Wowk et al., 1999; Baudot et Odagescu, 2004]). Ces vitesses permettent de donner un aperçu de l'efficacité de nombreux cryoprotecteurs pour former un verre. Ainsi, plus les vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement sont faibles, plus la procédure de vitrification sera facile à mettre en œuvre. Pour les cryoprotecteurs classiquement utilisés, le propylène glycol semble être le plus efficace, suivi par le DMSO, l'EG et le glycérol (Tableau 4). Il est d'autre part intéressant de remarquer que les vitesses critiques de réchauffement sont toujours beaucoup plus importantes que celles de refroidissement. Ces informations vont dans le sens des observations réalisées par Seki (risques de recristallisation pendant le réchauffement) [Seki et Mazur, 2009].

| | **Vitesses critiques de refroidissement (°C.min$^{-1}$)** | | | | **Vitesses critiques de réchauffement (°C.min$^{-1}$)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **PG[b]** | **DMSO** | **EG ([d]/[e])** | **Gly[c]** | **PG** | **DMSO** | **EG** | **Gly** |
| **35%[a]** | 555 | | | | 2x10$^{7}$ | | | |
| **40%** | 72 | 500 | 569/541 | | 160 | 9x10$^{9}$ | 10$^{10}$/-- | |
| **45%** | <5 | 14 | 63/197 | 464 | | 2600 | 10$^{6}$/8x10$^{5}$ | |
| **50%** | | <2,5 | <5/81 | 81 | | 15 | 853/250 | 10$^{6}$ |

**Tableau 4 : Vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement de solutions aqueuses contenant un cryoprotecteur.**

[a] : Concentrations en cryoprotecteur

[b] : propylène glycol

[c] : glycérol

[d] : valeurs obtenues par Baudot et al. [Baudot et Odagescu, 2004]

[e] : valeurs obtenues par Wowk et al. [Wowk et al., 1999]

Par ailleurs, le calcul des vitesses critiques [Boutron, 1986; Boutron et Mehl, 1990; Baudot et Odagescu, 2004] permet d'évaluer le rôle et l'importance des différents composés d'une solution de vitrification par rapport à la tendance de cette solution à former un verre.

Les vitesses critiques ont ainsi permis d'évaluer l'influence de modifications structurales des cryoprotecteurs sur leur aptitude à provoquer la formation d'un verre [Wowk et al., 1999]. Certains groupements hydroxyles (-OH) de trois polyols (EG, propylène glycol et glycérol) étaient remplacés par des groupements méthoxyles ($-OCH_3$). Il a été observé que cette substitution provoquait une diminution des vitesses critiques. Il a également été noté qu'une substitution d'un seul groupement hydroxyle suffisait, une double substitution provoquant la formation d'hydrates. Des composés méthoxylés pourraient donc être utilisés dans des solutions de vitrifications.

D'autres études ont porté sur l'addition de différentes molécules dans des solutions contenant des cryoprotecteurs afin de vérifier leur impact sur les propriétés de vitrification. L'utilisation de monosaccarides, de disaccharides, de polysaccharides, de dextrans, de ficoll ou de PVP a ainsi permis de diminuer les concentrations en EG présentes dans des solutions salines [Shaw et al., 1997; Kuleshova et al., 1999]. Il était également noté que les dextrans, ficoll et PVP limitaient les risques de fracture des verres formés. Dans deux autres études, il a été observé que le PVA inhibait la formation de glace dans des solutions de vitrification contenant du propanediol ou une association propanediol/DMSO [Wang et al., 2009a; Wang et al., 2009b].

## 2. Etude de la cristallisation dans les cellules et organismes vivants

Comme dit précédemment, la DSC permet d'obtenir de nombreux renseignements sur la cristallisation. Elle a donc été utilisée afin de mieux comprendre la formation de glace dans des organismes vivants. En particulier, plusieurs méthodes ont été évaluées afin d'étudier la formation de glace intracellulaire.

Une première étude a porté sur la formation de glace intracellulaire dans des ovocytes de Xénope [Kleinhans et al., 2006]. Pour ce faire, cinq refroidissements et réchauffements successifs ont été appliqués et étaient semblables à ceux employés pour l'optimisation de protocoles de congélation lente :

1. Un refroidissement rapide était tout d'abord effectué jusqu'à une température légèrement supérieure à la température de cristallisation. Cette dernière était induite grâce à des extraits de *Pseudomonas syringae* ;
2. Un refroidissement lent était ensuite appliqué pendant la formation de glace extracellulaire ;
3. Un réchauffement lent était appliqué jusqu'à une température légèrement inférieure au point de fusion de manière à provoquer la fusion de la majorité de la glace extracellulaire ;
4. Un refroidissement lent appliqué sur plusieurs degrés permettait la cristallisation de la majorité de la solution aqueuse ;
5. Un refroidissement rapide ($10°C.min^{-1}$) était ensuite effectué jusqu'à -50°C et permettait la formation de la glace intracellulaire.

Les formations de glace extra- et intracellulaire étant partiellement dissociées dans le temps, la cristallisation intracellulaire apparaissait sous forme de petits pics se surajoutant au pic de cristallisation extracellulaire (Figure 15).

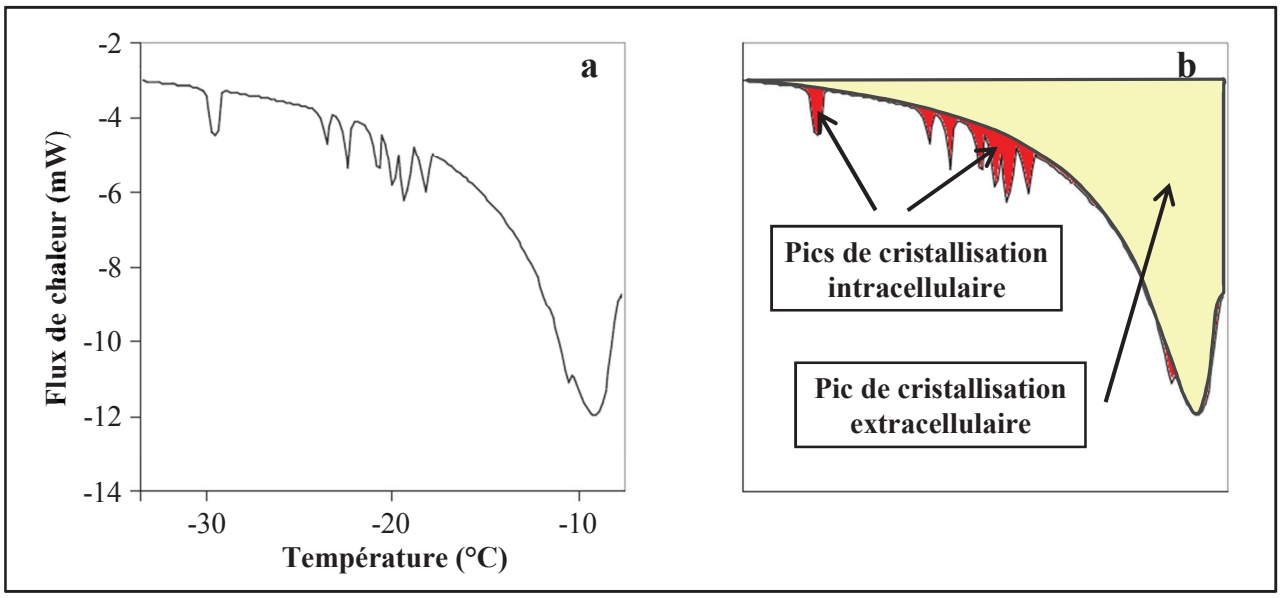



**Figure 15 : Thermogramme (a) et schéma explicatif (b) permettant la visualisation de de la cristallisation intracellulaire survenue au sein d'ovocytes de Xénope (d'après [Kleinhans et al., 2006])**
*Au pic de cristallisation extracellulaire (en beige) viennent se surajouter 8 pics de cristallisation (en rouge). Chaque pic correspond à la cristallisation intracellulaire survenant dans un des huit ovocytes de Xénope.*

Il a été observé que la cristallisation intracellulaire intervenait très rapidement chez les ovocytes les plus âgés. Il a été proposé que leur grande taille augmentait la probabilité d'un contact avec la glace extracellulaire qui est un élément nécessaire à la cristallisation intracellulaire [Mazur, 2004]. A l'inverse, la cristallisation intracellulaire intervenait plus tard sur des ovocytes plus jeunes. Les auteurs envisageaient donc d'utiliser ces ovocytes comme modèle dans la compréhension des mécanismes de formation de la glace intracellulaire. En particulier, l'introduction de porines dans leur membrane pourrait permettre de vérifier l'effet inducteur de la glace extracellulaire sur la cristallisation intracellulaire.

Une autre étude a rapporté l'impact de la vitesse de refroidissement sur la formation de glace intracellulaire dans des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) et son influence sur leur survie [Seki et al., 2009]. La formation de glace intracellulaire était détectée lors de plusieurs refroidissements et réchauffements successifs à vitesse constante.

Lors de l'ajout de levures dans une solution, une « épaule » était observée à la fin du pic de cristallisation (Figure 16). Cette épaule n'étant pas présente lors de la caractérisation de la solution seule, elle a été attribuée à deux phénomènes possibles :

- La chaleur dégagée par la cristallisation extracellulaire de l'eau sortant des levures à la suite de leur déshydratation ;
- La chaleur dégagée par une cristallisation intracellulaire se produisant dans les levures.

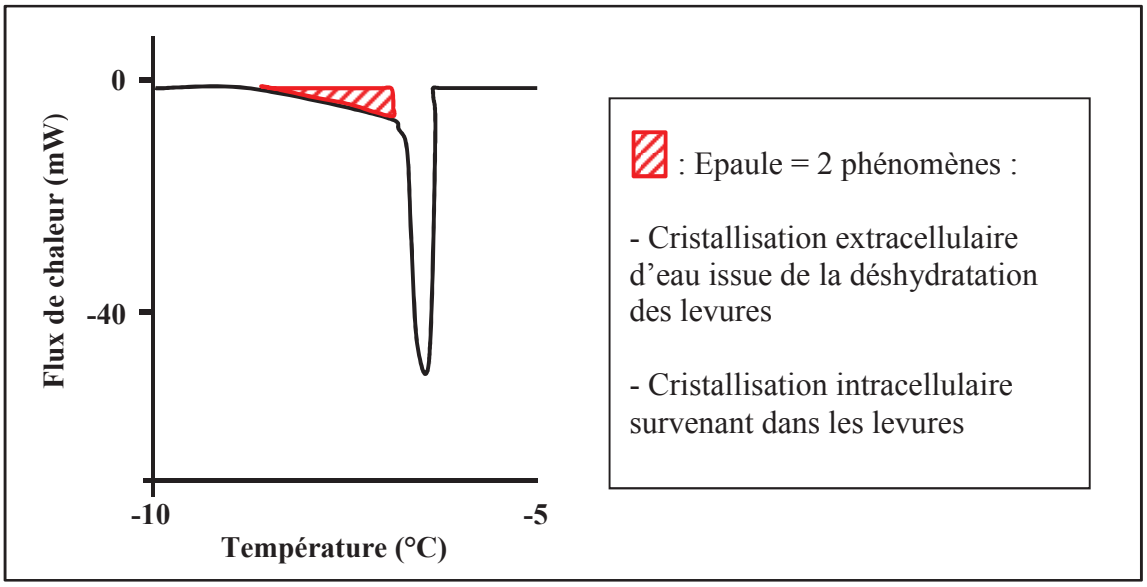



**Figure 16 : Thermogramme permettant la visualisation de la cristallisation survenant dans une solution contenant des levures (d'après [Seki et al., 2009])**
*L' « épaule » (en rayures) n'est pas présente lors de la caractérisation de la solution seule. Elle est donc issue de l'ajout de cellules dans la solution et de leur influence.*

La différence entre ces deux phénomènes ne pouvait pas être objectivée sur un seul pic de cristallisation. Néanmoins, la formation de glace intracellulaire s'accompagne d'une lyse des membranes cellulaires et donc d'un mélange du liquide intracytoplasmique avec la solution extracellulaire. Son apparition lors d'un refroidissement engendrait donc une diminution de l'aire de l'épaule lors du refroidissement suivant. La quantité de glace intracellulaire pouvait également être calculée à partir de la diminution d'aire observée. Dans le cas de cristallisation extracellulaire au contraire, les cellules restaient osmotiquement actives et les épaules observées lors de deux refroidissements successifs avaient des aires identiques.

Il a été observé qu'au-delà d'une vitesse de 20°C.min$^{-1}$, de la glace intracellulaire se formait. La quantité de glace intracellulaire était par ailleurs de plus en plus importante au fur et à mesure que la vitesse augmentait. Après comparaison avec d'autres études, il a été noté qu'une vitesse de refroidissement de 20°C.min$^{-1}$ était corrélée à une chute des taux de survie des levures. Il en a été déduit que l'apparition de glace intracellulaire était effectivement couplée à la mort cellulaire.

Enfin, une dernière étude a porté sur la compréhension des mécanismes de formation de la glace intraembryonnaire dans des embryons de poissons zèbres [Liu et al., 2001]. Lors de cette étude, les embryons étaient tout d'abord placés dans une capsule de test. L'eau les recouvrant était ensuite absorbée à l'aide d'un papier filtre de manière à éviter toute cristallisation extraembryonnaire. L'observation d'un pic de cristallisation sur les thermogrammes était donc liée à l'apparition de glace intraembryonnaire. La déshydratation des embryons était par ailleurs limitée par l'ajout d'une microgoutte d'huile de silicone sur chaque embryon dans la capsule.

Il a tout d'abord été observé que la température de cristallisation d'embryons intacts était supérieure à celle d'embryons dont le chorion avait été retiré. Il en a été déduit que la cristallisation intraembryonnaire était induite par la cristallisation du liquide périvitellin, elle-même induite par la glace extracellulaire. Cette dernière semble donc encore une fois jouer un

rôle dans la cristallisation ayant lieu dans des cellules ou organismes vivants. Les auteurs observaient également que la perméabilité des embryons au méthanol et au propylène glycol était faible et que le vitellus jouait un rôle dans la cristallisation intraembryonnaire. L'ensemble de ces informations pourraient permettre de concevoir des protocoles de congélation adaptés pour les embryons de poissons.

### 3. Aide à la compréhension des mécanismes naturels de résistance au froid des animaux

La DSC peut également être utilisée afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance de certains animaux à des températures négatives. Deux mécanismes permettent la survie de vertébrés ou d'invertébrés soumis à des basses températures : la tolérance ou l'évitement de la cristallisation de leurs fluides corporels [Ramlov, 2000]. Les animaux évitant la formation de glace ne peuvent survivre à la cristallisation de leurs tissus. Lors de leur exposition à des températures négatives, ils entrent donc en surfusion en accumulant des cryoprotecteurs. Les animaux tolérant la cristallisation peuvent au contraire survivre à l'apparition de glace dans leurs fluides corporels. La présence d'agents nucléants permet de déclencher la cristallisation à des températures de peu inférieures à 0°C et leur état de surfusion n'est jamais important. La DSC permet donc de faire la différence entre ces deux types de stratégies, en particulier par l'évaluation de $T_c$. Dans le cas d'une tolérance à la formation de glace, $T_c$ est relativement haute (supérieure à -10°C), alors qu'elle est relativement basse (inférieure à -10°C) lorsque les animaux évitent la formation de glace [Issartel et al., 2006].

La DSC a ainsi permis d'étudier plusieurs invertébrés dont les caractéristiques les classaient parmi les organismes tolérant la cristallisation [Wharton et Block, 1997; Issartel et al., 2006; Hengherr et al., 2009; Hengherr et al., 2010]. Il est néanmoins intéressant de remarquer que, lors d'une étude sur les tardigrades, les $T_c$ mesurées étaient relativement basses alors que ces animaux résistent à la formation de glace. Le déclenchement de la cristallisation par des agents nucléants ne semble donc pas obligatoire chez les animaux tolérant la formation de glace et des phénomènes de nucléation homogène existent également.

### 4. Optimisation de protocoles de cryoconservation chez les plantes

Pour finir, la DSC est également utilisée pour l'optimisation de protocoles de cryoconservation chez les plantes.

La cryopréservation des plantes nécessite une déshydratation préalable afin de réduire la quantité d'eau pouvant cristalliser. La DSC permet donc de vérifier le temps de déshydratation nécessaire afin que celle-ci soit suffisante et que de la glace n'apparaisse pas au refroidissement. Il a ainsi été montré qu'un temps de déshydratation de 3h permettait de favoriser une bonne cryoconservation de pousses de houblon [Martinez et al., 1998]. Pour des pousses d'olive, la donnée était quelque peu différente car un temps de déshydratation compris entre une 1 h 30 et 2 h 30 était nécessaire [Martinez et al., 2000]. En deçà, la déshydratation n'était pas suffisante et de la glace se formait. Au-delà, une transition vitreuse était visible, ce qui pourrait engendrer un phénomène de cristallisation lors du réchauffement. Il est donc important de déterminer la durée de dessiccation nécessaire pour éviter un phénomène de cristallisation au refroidissement et au réchauffement.

A l'instar de ce qui est fait pour les cellules animales, la DSC permet par ailleurs d'évaluer, pour un type de plante et une solution cryoprotectrice donnés, les durées d'équilibration et les vitesses de refroidissement nécessaires. Ainsi, des pousses de

millepertuis ont été congelées dans une solution contenant 10% de glycérol, 10% de DMSO et 0.58M de saccharose [Skyba et al., 2011]. Il a été montré qu'une équilibration de 3 h dans la solution cryoprotectrice avant de procéder à la congélation permettait de réduire à son minimum la quantité d'eau contenue dans les pousses. Lorsqu'une équilibration d'une heure était pratiquée, plus la vitesse de refroidissement était faible (0,1°C.min$^{-1}$) plus la déshydratation des pousses était importante. Lors de l'étude biologique, une vitesse de refroidissement de 0,1°C.min$^{-1}$ était également reliée aux meilleurs taux de survie et aux dommages tissulaires les moins importants après congélation. Néanmoins, il semblait que la déshydratation des pousses n'était pas un des facteurs majeurs pour expliquer les bons résultats des vitesses de refroidissement les plus basses.

---

En conclusion, la DSC est une méthode d'analyse physique qui permet l'obtention de grandeurs thermodynamiques caractéristiques de solutions de cryoconservation. Bien qu'ayant été essentiellement utilisée pour l'étude de solutions de vitrification, la DSC présente également de nombreux avantages dans l'étude des solutions de congélation lente. En particulier, elle permet l'obtention de trois caractéristiques physiques qui seront utilisées lors de l'étude expérimentale de ce travail :

- La température de cristallisation ($T_c$) ;
- La température de fin de fusion à l'équilibre ($T_m$) qui correspond à la température en dessous de laquelle une solution peut cristalliser ;
- La variation d'enthalpie de cristallisation ($\Delta H$) qui permet d'évaluer la quantité de glace formée dans une solution.

# *Etude expérimentale*

Comme exposé précédemment, l'utilisation de produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation est aujourd'hui la source de préoccupations importantes. Ceci est particulièrement vrai dans deux espèces : l'espèce bovine pour laquelle la barrière d'espèce n'existe pas, et l'espèce humaine pour laquelle la présence potentielle de prions et ses conséquences représentent un risque difficilement acceptable. Bien que l'utilisation de BSA réduise les risques sanitaires [Guérin et al., 1997; Givens et Marley, 2008], la pratique la plus sûre reste l'utilisation de produits d'origine non biologique [Guérin et al., 1997; Le Tallec et al., 2001]. A ce jour, de nombreux produits ont été utilisés comme substituants dans les solutions de cryoconservation mais les résultats obtenus ont été plus ou moins concluants.

Notre étude a donc eu pour objet l'évaluation d'un substituant potentiel (CRYO3, Réf. 5617, Stem Alpha, France) aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons. Actuellement, les protocoles de cryoconservation sont souvent élaborés par des méthodes empiriques [Woods et al., 2004]. Cet empirisme conduit à de nombreuses variations entre les protocoles expérimentaux, ce qui rend leur comparaison et l'interprétation des résultats difficiles. L'évaluation du CRYO3 a donc été réalisée en combinant deux approches complémentaires.

Dans un premier temps, une étude calorimétrique par DSC a permis la caractérisation thermodynamique de solutions de cryoconservation pour embryons contenant du CRYO3 ou un produit d'origine animale. Le SVF et la BSA ont été choisis comme produit de référence durant l'ensemble de l'étude. Cette approche fondamentale nous a permis de standardiser, dans nos conditions expérimentales, les critères de comparaison entre le substituant potentiel et les produits d'origine animale. Dans un deuxième temps, une approche biologique basée sur la congélation d'embryons de lapins et de bovins produits *in vitro* a permis la caractérisation des propriétés biologiques du CRYO3.

Comme vu précédemment, peu d'études ont porté sur la caractérisation de solutions de congélation lente pour embryons par DSC. En conséquence, une série d'études préliminaires a été réalisée afin d'optimiser notre utilisation du DSC et de favoriser une bonne

reproductibilité des mesures. La composition des SVF pouvant être relativement différente d'une référence à l'autre, ces études préliminaires ont également permis d'évaluer l'influence de différentes références de SVF sur les caractéristiques thermodynamiques de solutions de cryoconservation.

Enfin, les solutions de cryoconservation conservées à -20°C peuvent subir une évolution au cours du temps [Baudot, 1997]. Lors de l'étude sur le CRYO3, les conditions de stockage des solutions avant les tests ont donc été élaborées afin de minimiser cette évolution. Une étude a été réalisée en parallèle afin d'évaluer l'efficacité de ces conditions de stockage. Par ailleurs, les antibiotiques présents dans les solutions sont connus pour avoir une influence sur les propriétés thermodynamiques des solutions de cryoconservation [Salvetti et al., 2006]. L'influence de la présence d'antibiotiques sur l'évolution des propriétés physiques a donc également été investiguée. Ce travail sera abordé dans une troisième partie.

Durant l'ensemble de l'étude expérimentale, précision, reproductibilité et variabilité seront définies comme suit :

- Précision : variations des résultats liés à la valeur chiffrée donnée par le DSC ;
- Reproductibilité : variations des résultats lors de différentes mesures réalisées pour un échantillon donné dans des conditions expérimentales définies ;
- Variabilité : variations des résultats lors de différentes mesures réalisées pour des échantillons différents dans des conditions expérimentales définies.

# Evaluation du CRYO3 dans des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins et embryons de bovins produits *in vitro*

L'évaluation du CRYO3 dans des solutions de cryoconservation pour embryons a été réalisée en trois parties. :

- Tout d'abord, une approche physique a permis de comparer les propriétés thermodynamiques de solutions de cryoconservation contenant le substituant potentiel ou des produits d'origine animale. Lors de cette évaluation, le CRYO3 a été utilisé dans des conditions d'utilisation identiques au SVF (tampon de base, concentration et cryoprotecteur) de manière à pouvoir comparer leurs caractéristiques ;
- Dans une deuxième partie, les mêmes solutions de cryoconservation ont été évaluées par culture *in vitro* d'embryons de lapins et de bovins produits *in vitro* préalablement congelés/décongelés ;
- Enfin, dans une troisième partie, une approche *in vivo* a été réalisée dans l'espèce lapin de manière à vérifier si les résultats obtenus par culture *in vitro* étaient confirmés après transfert embryonnaire. Lors de cette troisième évaluation, le CRYO3 a été évalué selon deux conditions d'utilisation. D'une part, le CRYO3 a été utilisé dans les mêmes conditions que celles employées dans la première partie (utilisation d'un tampon de base dans lequel était rajouté du CRYO3 et du cryoprotecteur). D'autre part, suite aux recommandations du fabricant, le CRYO3 a été utilisé comme solution de base dans laquelle a simplement été ajouté du cryoprotecteur.

Un résumé global de l'étude sur l'évaluation du CRYO3 est illustré par la Figure 17. Un résumé des solutions, embryons et approches utilisés, est également disponible dans le Tableau 5.

## I. Matériel et méthodes

### *A. Première partie : Evaluation thermodynamique de solutions utilisées pour la congélation d'embryons de lapins et de bovins produits in vitro*

#### 1. Elaboration des solutions de cryoconservation

Les solutions de cryoconservation testées ont été identiques dans l'approche thermodynamique et dans l'approche biologique *in vitro* pour chaque type d'embryons. Afin de pouvoir comparer les propriétés du substituant potentiel à celles du SVF, deux solutions de base sans composé macromoléculaire ont été élaborées, une pour chaque type d'embryons. L'addition de SVF ou du substituant potentiel permettait ensuite de finaliser les solutions testées qui ne différaient donc que par le composé macromoléculaire présent.

Afin de favoriser une bonne homogénéité de leur composition, les solutions de cryoconservation pour chaque type d'embryons ont été préparées simultanément. La solution de base était re-préparée avant chaque série de test et non stockée à -20°C de manière à éviter son évolution. La DSC étant une méthode extrêmement sensible, des précautions ont été prises durant l'élaboration des solutions afin d'éliminer toute impureté qui aurait pu interférer avec les mesures. La verrerie et le matériel utilisés pour préparer les solutions étaient ainsi à usage unique ou lavés plusieurs fois puis stérilisés. De même, les solutions ont été préparées sous une hotte à flux laminaire. Enfin, la solution de base était filtrée sur 0,20 µm avant ajout

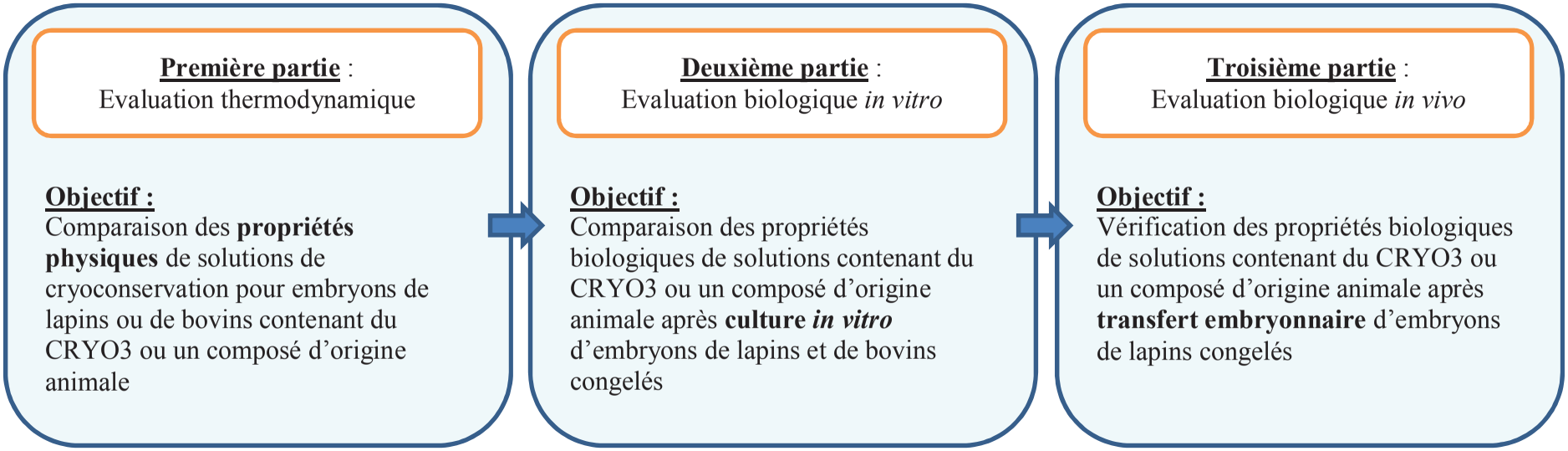



**Figure 17 : Schéma global de l'étude sur l'évaluation du CRYO3**

**Tableau 5 : Embryons, solutions et approches utilisés lors de l'évaluation du CRYO3**

| Embryons | Tampon de base | Composé macromoléculaire | Cryoprotecteurs | Approche thermodynamique | Approche biologique *in vitro* | Approche biologique *in vivo* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Lapin** | D-PBS | SVF (18%) | DMSO (10%) | Oui + vérification des propriétés des solutions utilisées pour la congélation | Oui | Oui |
| | | CRYO3 (18%) | | | | |
| | CRYO3 | | | Vérification des propriétés des solutions utilisées pour la congélation | Non | Oui |
| | « IMV holding medium » (présence de 4 $g.l^{-1}$ de BSA) | | | | | |
| **Bovin produits *in vitro*** | D-PBS | SVF (20%) | EG (1,5M) + saccharose (0,1M) | Oui | Oui | Non |
| | | CRYO3 (20%) | | | | |
| | Milieu de congélation pour embryon avec EG (IMV ; ajout de 0,1M de saccharose ; présence de 4 $g.l^{-1}$ de BSA) | | | | | |

du composé macromoléculaire. Après leur fabrication, les conditions de stockage des solutions ont été choisies afin de minimiser les risques d'évolution. Les solutions de cryoconservation ont ainsi été stockées dans des petits flacons en verre fermés par un bouchon en téflon et scellés à l'aide de parafilm. Elles étaient ensuite congelées à -20°C à l'abri de la lumière puis testées dans un délai de trois semaines maximum après leur fabrication.

Dans une étude préliminaire, il a été observé que les propriétés thermodynamiques de solutions de cryoconservation contenant des références de SVF différentes pouvaient être variables. En conséquence, trois SVF ont été utilisés comme références pour cette étude thermodynamique : le SVF F2442 (Sigma, France), le SVF BWSTS/181L (VWR, France) et le SVF 10500-056 (Gibco, France). Pour des raisons pratiques, un seul de ces trois SVF a ensuite été sélectionné comme référence lors de l'évaluation biologique. Ce choix a été basé sur la stabilité des résultats obtenus avec les solutions contenant un SVF pendant la première évaluation thermodynamique (évaluation des solutions pour embryons de lapins). Pour ce faire, le nombre de répétitions permettant l'évaluation physique de ces solutions a été augmenté (n = 9 au lieu de n = 3 classiquement). Dans nos conditions expérimentales, les plus faibles variations ont été observées avec le SVF F2442 (Sigma). Ce dernier a donc été sélectionné pour l'évaluation biologique. Pour des raisons de commodités, les SVF F2442, BWSTS/181L et 10500-056 seront appelés SVF1, SVF2 et SVF3 respectivement pour la suite de l'étude.

### *a) Solutions pour embryons de lapins*

Les solutions de cryoconservation pour embryons de lapins étaient composées de Dulbecco's phosphate buffered saline contenant $CaCl_2$ et $MgCl_2$ (D-PBS, Réf. 9662, Sigma, France) supplémenté de 10% de DMSO ($v.v^{-1}$) (Réf. D2650, Sigma, France) et de 18% de SVF ou de CRYO3 ($v.v^{-1}$). De plus, une solution sans composé macromoléculaire a été utilisée comme contrôle afin d'évaluer l'influence des SVF et du CRYO3 sur les propriétés thermodynamiques des solutions de cryoconservation.

### *b) Solutions pour embryons de bovins*

Les solutions de cryoconservation pour embryons de bovins produits *in vitro* étaient composées de D-PBS contenant $CaCl_2$ et $MgCl_2$ supplémenté de 1,5M d'EG (Réf. 33068, Sigma, France), de 0,1M de saccharose (Réf. S9378-500G, Sigma, France) et de 20% de SVF ou de CRYO3 ($v.v^{-1}$). Par ailleurs, une solution commerciale classiquement utilisée pour la cryoconservation d'embryons bovins et contenant 4 $g.l^{-1}$ de BSA a également été utilisée comme référence (Réf. 019447, IMV, France). Néanmoins, cette solution contenait uniquement 1,5 M d'EG en tant que cryoprotecteur. 0,1 M de saccharose ont donc été rajoutés afin de conserver les mêmes cryoprotecteurs que ceux présents dans les autres solutions.

## 2. Evaluation thermodynamique

Les transitions de phase des différentes solutions ont été caractérisées grâce à un calorimètre différentiel à balayage à compensation de puissance (DSC Diamond, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Le calorimètre était équipé d'un cryofill, dispositif permettant de travailler à basse température en présence d'azote liquide, et du logiciel Pyris (version R9,1) permettant la collecte des données. Le DSC a été calibré en température et énergie grâce à deux standards : la réaction de fusion de la glace de l'eau osmosée (0,00°C ; $\Delta H_{eau}$ = 333,0 $J.g^{-1}$) et la transition cristallographique du cyclohexane en son état solide (-

87,06°C ; 79,56 $J.g^{-1}$). La validité de cette calibration a été vérifiée régulièrement par des tests sur de l'eau osmosée.

Après la calibration du DSC, des mesures additionnelles réalisées sur les deux standards ont permis d'évaluer la reproductibilité des mesures du DSC dans nos conditions d'utilisation. L'incertitude de mesure maximale obtenue avec de l'eau osmosée et du cyclohexane était de 0,11°C pour la température et de 1,14% pour l'énergie (Tableau 6). Ces résultats étaient parfaitement concordants avec les spécifications techniques du DSC fournies par le constructeur (±0,11°C pour la température et ±1,10% pour l'énergie). Cette concordance a donc validé les conditions expérimentales dans lesquelles ont été réalisées les différentes mesures.

**Tableau 6 : Reproductibilité des mesures pour deux échantillons de référence**

| Echantillon | masse | Valeur attendue / valeur la plus éloignée (erreur) | |
|---|---|---|---|
| | | $T_m$ | $\Delta H$ |
| Eau osmosée (n = 1) | 3,8 mg | 0,00°C / 0,08°C (0,08°C) | 333,0 $J.g^{-1}$ / 336,73 $J.g^{-1}$ (1,14%) |
| Cyclohexane (n = 1) | 2,8 mg | -87,06°C / -86,95°C (0,11°C) | 79,56 $J.g^{-1}$/ 79,50 $J.g^{-1}$ (0,1%) |

Durant l'expérimentation, chaque flacon contenant une solution de cryoconservation n'a été utilisé que pour un seul test de manière à éviter une évolution des propriétés physiques de la solution suite à la décongélation et à l'ouverture du flacon. Pour chaque test, un flacon était préalablement placé pendant une vingtaine de minutes à température ambiante afin de permettre la décongélation de la solution de cryoconservation. La solution était alors prélevée puis déposée dans une capsule standard de 20 µL conçue pour échantillons volatiles (Réf. 0219-0062, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) et préalablement pesée sur une balance de précision (AE240, Mettler, Suisse). Une étude préliminaire avait montré qu'une variation dans la masse des échantillons engendrait une variabilité importante des résultats (Tableau 7). L'utilisation d'une micropipette pour le prélèvement des solutions s'est donc révélée indispensable afin de garantir une bonne reproductibilité des mesures. Après avoir été scellée, la capsule était pesée de nouveau de manière à connaître avec précision la masse de l'échantillon (erreur inférieure à 0,02 mg). La capsule était enfin pesée à la fin des mesures de manière à vérifier son étanchéité. Dans ces conditions, la masse moyenne des échantillons était de 5,47 mg ± 0,57 (moyenne ± SD, n = 45) pour l'expérimentation sur les solutions pour embryons de lapins et de 5,25 mg ± 0,28 (n = 27) pour l'expérimentation sur celles pour embryons de bovins produits *in vitro*.

**Tableau 7 : Reproductibilité des mesures en fonction de la masse de l'échantillon**

| Echantillon | masse | Variations maximales | |
|---|---|---|---|
| | | $T_m$ | $\Delta H$ |
| Masses proches (n = 4) | 7,06 ± 0,31 mg<br>3,02 ± 0,17 mg | 0,4°C | 5,2 $J.g^{-1}$ |
| Masses variables (n = 4) | 7,81 ± 5,63 mg | 3,1°C | 22,1 $J.g^{-1}$ |

Deux caractéristiques thermodynamiques ont été déterminées lors des mesures : la $T_m$ $\Delta H$. Ces caractéristiques ont été choisies dans la mesure où elles permettent une bonne caractérisation des solutions de congélation lente. Pour ce faire, deux cycles successifs de refroidissement et de réchauffement ont été appliqués entre 10°C et -150°C. Il est également important de noter que, dans des solutions aqueuses, l'eau a tendance à s'évaporer puis à condenser au sommet de la capsule, ce qui peut perturber les mesures. En conséquence, les

intervalles de temps entre les réchauffements et les refroidissements successifs ne dépassaient pas une minute. Un exemple de thermogramme ainsi qu'un schéma de son analyse sont disponibles sur la Figure 10.

Dans un premier temps, un refroidissement rapide (-100°C.min$^{-1}$) était suivi par un réchauffement lent (2,5°C.min$^{-1}$) pour déterminer $T_m$. La vitesse de 2,5°C.min$^{-1}$ a été choisie car il s'agit d'une vitesse de référence à laquelle de nombreuses solutions de cryoconservation ont été caractérisées par DSC [Baudot et al., 2000; Baudot et Odagescu, 2004]. Malgré nos précautions pour éviter l'évaporation d'eau, un petit pic parasite a été systématiquement observé au-dessus du pic principal lors du premier réchauffement. Ce pic grandissait ensuite au fur et à mesure des cycles effectués. Ce pic a déjà été décrit dans d'autres études [Boutron, 1984] et était probablement dû à l'évaporation d'une partie de l'eau de la solution lors du temps d'équilibration au début de la mesure. Dans la mesure où son aire était beaucoup plus petite que celle du pic principal, ce pic parasite n'a pas été pris en compte dans la mesure de $T_m$. $T_m$ était déterminée au sommet du pic principal de fusion.

Dans un second temps, un refroidissement lent (-2,5°C.min$^{-1}$) était suivi d'un réchauffement rapide (20°C.min$^{-1}$) de manière à déterminer $\Delta H$. $\Delta H$ était mesurée par évaluation de l'aire comprise entre le pic de cristallisation et la ligne de base.

Enfin, durant l'expérimentation lapin, une troisième grandeur thermodynamique a été mesurée afin de sélectionner le SVF le plus stable utilisé ultérieurement lors de l'approche biologique : $T_c$. Cependant, à la différence de $T_m$ et $\Delta H$ qui dépendent essentiellement de la composition de l'échantillon, $T_c$ est très dépendante des conditions expérimentales. En conséquence, $T_c$ peut être très variable et n'a été utilisée que pour le choix du SVF le plus stable thermodynamiquement. $T_c$ était mesurée au départ du pic de cristallisation durant le refroidissement lent à 2,5°C.min$^{-1}$.

## *B. Deuxième partie : Evaluation biologique in vitro chez les embryons de lapins et de bovins produits in vitro*

### 1. Solutions utilisées

Comme dit précédemment, les solutions utilisées lors de l'approche biologique *in vitro* étaient identiques à celles utilisées lors de l'approche thermodynamique.

Les solutions pour embryons de lapins étaient donc composées de D-PBS supplémenté de 10% de DMSO et de 18% de SVF ou de CRYO3.

Les solutions pour embryons de bovins produits *in vitro* étaient composées de D-PBS supplémenté de 1,5M d'EG, de 0,1M de saccharose et de 20% de SVF ou de CRYO3. La solution commerciale contenant 4 g.l$^{-1}$ BSA et à laquelle ont été rajoutés 0,1M de saccharose a également servi de référence.

### 2. Embryons de lapins

L'ensemble de l'expérimentation a été mené en accord avec les directives européennes 2010/63/EU sur les soins et l'utilisation des animaux à usage scientifique. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique du campus vétérinaire de VetAgro Sup (N° du protocole : 2012/1232).

L'étude a été réalisée dans un cadre zootechnique chez un éleveur sélectionneur (SARL Hycole, Marcoing, France). Les lapines utilisées étaient de race croisée New-Zealand et étaient logées dans les mêmes conditions d'élevage par groupes de deux à quatre dans un bâtiment d'élevage à accès réglementé.

### *a) Traitement hormonal des lapines et collecte des embryons*

Les traitements de superovulation et la récupération des embryons ont été effectués selon le protocole décrit par Salvetti et al. [Salvetti et al., 2007]. La superovulation des lapines a été induite 60 h avant l'IA par cinq injections sous cutanées de pFSH (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) réalisées à 12h d'intervalle. Juste après l'insémination, une injection de buséréline (Receptal®, MSD Santé Animale, France) a permis de provoquer l'ovulation.

Les tractus génitaux des lapines ont été récupérés 65 à 72 h post-insémination après abattage. Une perfusion normograde de chaque oviducte et de la corne utérine attenante avec une solution isotonique (Euroflush®, IMV technologies, France) a alors permis la récupération des embryons au stade morula. Après évaluation morphologique, les embryons ont été conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2 h au maximum avant congélation.

Un total de 152 embryons a été récupéré. Les embryons issus de chaque lapine ont été aléatoirement distribués entre deux groupes : *(i)* 76 embryons dans le groupe SVF, congelé dans la solution de cryoconservation contenant 18% de SVF1 et *(ii)* 76 embryons dans le groupe CRYO3, congelé dans la solution de cryoconservation contenant 18% de CRYO3.

### *b) Congélation et réchauffement des embryons*

Les embryons ont été congelés selon le protocole de congélation lente décrit par Joly et al. [Joly et al., 1998]. Les embryons ont tout d'abord été équilibrés à température ambiante dans trois bains successifs constitués de D-PBS, de 18% du composé macromoléculaire choisi et de concentrations croissantes de DMSO (3,3%, 6,7% puis 10%). Chaque équilibration a duré 5 min. A la fin de la période d'équilibration, entre cinq et 25 embryons ont été montés dans des paillettes stériles standards de 0,25 ml (IMV, France) qui ont ensuite été scellées par un bouchon stérile.

Les paillettes ont ensuite été placées directement dans un congélateur programmable (Cryocell 1200, IMV, France) préalablement refroidi à -7°C. Après 5 min d'équilibration, le « seeding » a été induit par l'intermédiaire d'un écouvillon préalablement refroidi dans de l'azote liquide. Après une seconde période d'équilibration de 10 min, les embryons ont été refroidis à la vitesse de 0,5°C.min$^{-1}$ jusqu'à -30°C. Une fois cette température atteinte, les paillettes ont été plongées directement dans l'azote liquide où elles ont été stockées pendant une semaine.

La décongélation a été réalisée en plaçant les paillettes dans l'air à température ambiante pendant 10 à 15 s jusqu'à disparition des cristaux de glace, puis dans un bain-marie à 20°C pendant 1 min. Le contenu des paillettes était alors vidé dans une boîte de pétri dans laquelle les embryons étaient collectés. Les embryons ont ensuite été placés à température ambiante dans trois bains successifs d' « IMV holding medium » (IMV, France) contenant des concentrations décroissantes de DMSO (6,7%, 3,3% puis 0% de DMSO) de manière à retirer ce dernier tout en réhydratant les embryons.

### *c) Mise en culture in vitro et évaluation de la viabilité des embryons congelés*

Après décongélation, l'ensemble des embryons de chaque groupe a été récupéré puis placé en culture à 38,5°C dans du KSOM (EmbryoMax® KSOM Embryo Culture, Millipore, France) sous 5% de $CO_2$ dans l'air et une atmosphère saturée en humidité. Le taux de survie

embryonnaire a été évalué après 48 h de culture *in vitro* par la capacité des embryons congelés à reprendre leur développement jusqu'aux stades blastocyste ou blastocyste expansé.

## 3. Embryons de bovins produits *in vitro*

### *a) Production des embryons*

Collecte des ovocytes et maturation *in vitro*

La collecte et la maturation *in vitro* des ovocytes ont été réalisées selon le protocole décrit par Guyader-Joly et al. [Guyader-Joly et al., 1999]. Des ovaires bovins ont été collectés aux abattoirs et transportés au laboratoire en moins de 4 h dans une solution à 30-32°C de PBS (IMV, France). Les complexes cumulo-ovocytaires immatures ont alors été aspirés par ponction de follicules antraux de 3 à 8 mm de diamètre à l'aide d'une aiguille de 18 gauges connectée à une pompe péristaltique. Les complexes ont été recueillis dans un milieu TCM-199 tamponné à l'HEPES (Sigma, France) et supplémenté avec 10% de sérum de vache en œstrus (SVO, préparé au laboratoire). Ils ont ensuite été séparés du fluide folliculaire par sédimentation (15 min).

La sélection des ovocytes a été effectuée selon la morphologie de leurs cumulus (cumulus non atrétiques, uniformes et non expansés). Leur maturation a été effectuée dans du TCM-199 (Sigma, France) supplémenté avec 10% de SVF (Fisher Scientific, France), 10 $\mu g.ml^{-1}$ de pFSH, 12 $\mu g.ml^{-1}$ de pLH (Reprobiol, France), 1 $\mu g.ml^{-1}$ d'œstradiol (Sigma, France) et 5 $ng.ml^{-1}$ d'EGF (Sigma, France). Des groupes de 30 à 35 complexes cumulo-ovocytaires ont été cultivés pendant 22 à 24 h à 39°C dans des puits contenant 700 µl de milieu de maturation, sous 5% de $CO_2$ dans l'air et une atmosphère saturée en humidité.

Fertilisation *in vitro*

Après maturation, les ovocytes ont été lavés deux fois dans le milieu de FIV. Ce dernier était constitué d'une solution de Tyrode modifiée (préparée au laboratoire) supplémentée avec 10 $\mu g.ml^{-1}$ d'héparine (Sigma, France), 20 µM de pénicillamine (Sigma, France), 10 µM d'hypotaurine (Sigma, France) et 1 µM d'adrénaline (Sigma, France). Des groupes de 20 à 25 ovocytes matures ont été incubés dans des puits contenant 500 µl de milieu.

La préparation du sperme a été effectuée par décongélation d'un éjaculat unique de taureau dans un bain-marie à 37°C pendant 1 min puis par centrifugation sur un gradient de densité (Bovipure®, Nidacon International AB, Suède). Après élimination du surnageant, les spermatozoïdes ont été remis en suspension dans du milieu de fertilisation et comptés grâce à un hémocytomètre. La suspension de spermatozoïdes a été ajoutée dans chaque puits contenant les complexes cumulo-ovocytaires maturés à la concentration de $10^6$ cellules par ml. L'incubation a eu lieu pendant 18 à 20 h, à 38,5°C, sous 5% de $CO_2$ dans l'air et une atmosphère humide.

Culture *in vitro*

Les zygotes présumés ont été séparés des cellules du cumulus par des pipetages répétés. Ils ont ensuite été lavés deux fois dans du milieu de culture. Ce dernier était composé d'un milieu SOF modifié (mSOF, Minitüb, GmbH, Allemagne) supplémenté avec du milieu « MEM essential and non essential amino acids » (Sigma, France), 0,6% de BSA sans acide gras (Sigma, France) et 1% de SVO. Des groupes d'environ 25 zygotes ont été cultivés pendant 6 j dans des microgouttes de 50 µl de milieu recouvertes d'huile minérale. L'ensemble était placé à 38,5°C sous 5% de $CO_2$, 5% d'$O_2$, 90% de $N_2$ et une atmosphère saturée en humidité.

Après 2 j de culture, le clivage des embryons a été vérifié et toutes les structures n'ayant pas subi de clivage ont été éliminées. Le développement embryonnaire et la qualité des embryons ont été évalués 7 j après la fertilisation conformément aux indications de l'IETS [Stringfellow et Givens, 2010]. Seuls les blastocystes expansés de qualité 1 ont été sélectionnés pour le protocole de cryoconservation.

### *b) Congélation et réchauffement des embryons*

Cent quarante-neuf embryons ont été produits et congelés en sept répétitions. Lors de chaque répétition, les blastocystes expansés ont été aléatoirement distribués entre trois groupes en fonction des solutions de congélation utilisées : *(i)* 45 embryons dans le groupe BSA, congelé dans la solution commerciale contenant 4 $g.l^{-1}$ de BSA, *(ii)* 50 embryons dans le groupe SVF, congelé dans la solution contenant 20% SVF1 et *(iii)* 54 embryons dans le groupe CRYO3, congelé dans la solution contenant 20% de CRYO3.

Les embryons ont été congelés de manière conventionnelle grâce à un congélateur programmable (Nicoll Bag MS21, IMV, France). Ils étaient tout d'abord équilibrés dans la solution de cryoconservation pendant 10 min. Durant cette période, entre cinq et dix embryons étaient montés dans une paillette stérile standard de 0,25 ml (IMV, France) qui était ensuite scellée par un bouchon stérile.

A la fin de la période d'équilibration, les paillettes étaient placées dans le congélateur programmable préalablement refroidi à -7°C. Après 5 min d'équilibration, le « seeding » a été induit manuellement. Après une seconde période d'équilibration de 10 min, les embryons ont été refroidis à la vitesse de 0,5°C.$min^{-1}$ jusqu'à -32°C. Une fois cette température atteinte, les paillettes ont été plongées directement dans l'azote liquide où elles ont été stockées pour au moins une semaine.

La décongélation a été réalisée en plaçant les paillettes dans l'air à température ambiante pendant 10 s puis dans un bain-marie à 20°C pendant 20 s. Les paillettes étaient ensuite séchées avant d'être coupées pour expulser leur contenu dans une boîte de pétri. Une fois collectés, les embryons ont été réhydratés pendant 8 min à température ambiante dans un bain d' « IMV holding medium » (IMV, France) avant d'être rincés deux fois dans le milieu de culture.

### *c) Mise en culture in vitro et évaluation de la viabilité des embryons congelés*

Après décongélation, l'ensemble des embryons a été récupéré puis transféré dans un milieu de culture composé de mSOF supplémenté avec 10% de SVO. Les embryons ont été cultivés pendant 72h à 38,5°C dans des microgouttes de milieu recouvertes d'huile minérale sous une atmosphère humide composée de 5% de $CO_2$, 5% d'$O_2$ et 90% de $N_2$.

La viabilité embryonnaire a été évaluée par la capacité des embryons à développer de nouveau leur blastocœle après 24 à 48 h de culture *in vitro* (taux de survie) et d'éclore après 24, 48 et 72 h de culture *in vitro* (taux d'éclosion).

## *C. Troisième partie : Evaluation biologique in vivo sur les embryons de lapins*

L'ensemble de l'expérimentation a également été mené en accord avec les directives européennes 2010/63/EU sur les soins et l'utilisation des animaux à usage scientifique. Le

protocole a été approuvé par le comité d'éthique du campus vétérinaire de VETAGRO SUP (N° du protocole : 2012/1232).

L'étude a été réalisée dans des conditions zootechniques identiques à celles utilisées lors de l'approche biologique *in vitro* chez les embryons de lapins (logement, alimentation… etc.).

## 1. Solutions utilisées

Lors de l'étude *in vivo*, le CRYO3 a été évalué selon deux conditions d'utilisation. Deux expérimentations successives ont été réalisées. Une synthèse de ces deux expérimentations est présentée dans le Tableau 8.

**Tableau 8 : solutions utilisées et nombre d'embryons congelés et transférés lors des expérimentations *in vivo***

| | **Solutions utilisées** | | **Nombre d'embryons** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **Congelés** | **Transférés** |
| **Première expérimentation *in vivo*** | D-PBS + 10% DMSO | 18% SVF1 (Groupe SVF) | 134 | 120 |
| | | 18% CRYO3 (Groupe CRYO3) | 142 | 118 |
| **Deuxième expérimentation *in vivo*** | « IMV holding medium » + 10% DMSO (Groupe BSA) | | 186 | 178 |
| | CRYO3 + 10% DMSO (Groupe CRYO3/100) | | 185 | 185 |

Lors de la première expérimentation, le CRYO3 a été comparé au SVF1 dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de l'étude thermodynamique et lors de l'étude *in vitro*. Les solutions étaient donc composées de D-PBS supplémenté de 10% de DMSO et de 18% de SVF1 ou de CRYO3.

Dans la deuxième expérimentation, le CRYO3 a été utilisé comme solution de base avec ajout de DMSO pour finaliser la solution de cryoconservation. Les propriétés biologiques *in vivo* de cette solution ont été comparées à celles d'une solution composée d' « IMV holding medium » à laquelle a également été ajouté du DMSO. Cette dernière solution a été choisie dans la mesure où elle est classiquement utilisée pour la réalisation de transferts embryonnaires. Les résultats attendus sont donc très bien connus. Les solutions comparées étaient donc composées de CRYO3 ou d' « IMV holding medium », chacun supplémenté avec 10% de DMSO.

Une partie des solutions utilisées pour les transferts embryonnaires a été conservée afin d'être testée sur le DSC et ainsi vérifier leurs propriétés thermodynamiques.

## 2. Récupération des embryons et protocole de congélation

Les protocoles de récupération et de congélation des embryons étaient identiques à ceux utilisés dans l'étude *in vitro*. La seule différence a concerné les solutions d'équilibration avant congélation pour les solutions composées de CRYO3 ou d' « IMV holding medium » supplémentés avec 10% de DMSO. Pour ces dernières, les solutions d'équilibration étaient composées de CRYO3 ou d' « IMV holding medium » supplémentés avec 3,3%, 6,7% puis 10% de DMSO.

Lors de la première expérimentation, un total de 276 embryons a été récupéré. Les embryons issus de chaque lapine ont été aléatoirement distribués entre deux groupes : *(i)* 134 embryons dans le groupe SVF, congelé dans la solution de cryoconservation contenant 18% de SVF1 et *(ii)* 142 embryons dans le groupe CRYO3, congelé dans la solution de cryoconservation contenant 18% de CRYO3.

Lors de la deuxième expérimentation, un total de 371 embryons a été récupéré. Les embryons issus de chaque lapine ont été aléatoirement distribués entre deux groupes : *(i)* 186 embryons dans le groupe BSA, congelé dans la solution basée sur l' « IMV holding medium » et *(ii)* 185 embryons dans le groupe CRYO3/100, congelé dans la solution de cryoconservation basée sur le CRYO3.

### 3. Protocole de transfert et évaluation de la survie embryonnaire

Après décongélation, les transferts embryonnaires ont été réalisés selon le protocole décrit par Salvetti et al. [Salvetti et al., 2007]. Une injection intramusculaire de d'acétate de buséréline a permis d'induire l'ovulation 50 à 60 h avant transfert. Les receveuses ont été anesthésiées à l'aide d'une injection intramusculaire de kétamine (Imalgène 1000®, Mérial, France) et de xylazine (Rompun® 2%, Bayer, France) une dizaine de minute avant l'intervention. Une anesthésie gazeuse à base d'isoflurane (vetflurane®, Virbac, France) a été mise en place pour la chirurgie. Après décongélation, les embryons ont été rapidement montés dans un capillaire de transfert en verre de 50 µl contenant un minimum d' « IMV holding medium » et connecté à une seringue de 1 ml. Une moyenne de 10,4 embryons a été transférée dans la lumière des cornes utérines des receveuses après laparotomie médiane. La viabilité *in vivo* des embryons a été évaluée grâce au taux de mise bas (nombre de femelles donnant naissance à au moins un lapereau/nombre de femelles transférées), le taux total de naissance (nombre de lapereaux nés/nombre d'embryons transférés) et le taux de naissance de lapereaux vivants (nombre de lapereaux nés vivants/nombre d'embryons transférés).

La première expérimentation a permis le transfert de 120 embryons du groupe SVF et 118 embryons du groupe CRYO3 sur 24 lapines synchronisées. Lors de la deuxième expérimentation, 178 embryons du groupe BSA et 185 embryons du groupe CRYO3/100 ont été transférés sur 34 receveuses.

## *D. Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R [R Development Core Team]. La normalité des distributions des valeurs obtenues lors de l'évaluation thermodynamique a été vérifiée grâce au test de normalité de Shapiro-Wilk. Les valeurs obtenues avec les solutions de cryoconservation pour embryons de lapins et de bovins ne suivaient pas toutes une distribution gaussienne. La comparaison des propriétés thermodynamiques des solutions a été réalisée grâce à des statistiques descriptives effectuées sur deux critères : la valeur moyenne des propriétés et la variabilité des différentes valeurs obtenues.

Concernant les évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo*, les taux de survie, les taux d'éclosions, les taux de mise bas, les taux totaux de naissance et les taux de naissance de lapereaux vivants ont été comparés grâce au test exact de Fisher. Les résultats statistiques ont été considérés comme significatifs lorsque la valeur de $p$ était inférieure à 0,05. Dans le cas de résultats significativement différents, un test de puissance a également été effectué après l'achèvement de l'expérimentation afin de vérifier le nombre d'embryons utilisé dans chaque groupe et ainsi vérifier la validité de nos conclusions.

# II. Résultats

## A. *Evaluation thermodynamique*

### 1. Solutions pour embryons de lapins

#### *a) Caractéristiques thermodynamiques des solutions contenant du SVF*

Les valeurs moyennes de $T_m$ et $\Delta H$ étaient proches entre les différentes solutions contenant un SVF (Tableau 9). En effet, la valeur moyenne la plus haute et la valeur moyenne la plus basse étaient seulement séparées par 0,14°C et 2,46 $J.g^{-1}$ respectivement.

**Tableau 9 : Caractéristiques thermodynamiques des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins (moyenne ± SD)**

| | $T_m$ (°C) | $\Delta H$ ($J.g^{-1}$) |
|---|---|---|
| D-PBS + 10% DMSO (n = 9, solution contrôle sans CM[a]) | -3,33 ± 0,27 | 185,06 ± 2,62 |
| D-PBS + 10% DMSO + 18% SVF1 (n = 9) | -3,01 ± 0,38 | 180,49 ± 2,54 |
| D-PBS + 10% DMSO + 18% SVF2 (n = 9) | -3,15 ± 0,28 | 180,82 ± 3,61 |
| D-PBS + 10% DMSO + 18% SVF3 (n = 9) | -3,12 ± 0,38 | 178,36 ± 7,88 |
| Moyennes globales des solutions contenant du SVF (n = 27) | -3,10 ± 0,34 | 179,89 ± 5,13 |
| D-PBS + 10% DMSO + 18% CRYO3 (n = 9) | -2,76 ± 0,36 | 183,39 ± 3,58 |

[a]: Composé macromoléculaire

A l'inverse, les distributions des différentes valeurs de $T_m$ et $\Delta H$ étaient très différentes entre les solutions. En ce qui concerne $T_m$, les plus faibles variations ont été observées avec la solution contenant du SVF2. Huit des neuf valeurs étaient ainsi comprises entre -3,06°C et -3,39°C (Figure 18). Cependant, la neuvième valeur était assez éloignée des huit autres (-2,46°C). Les solutions contenant du SVF1 ou du SVF3 ont engendré des variations plus importantes. Les valeurs obtenues avaient des distributions similaires et étaient uniformément réparties entre -2,54°C et -3,77°C (SVF1) et -2,51°C et -3,83°C (SVF3).

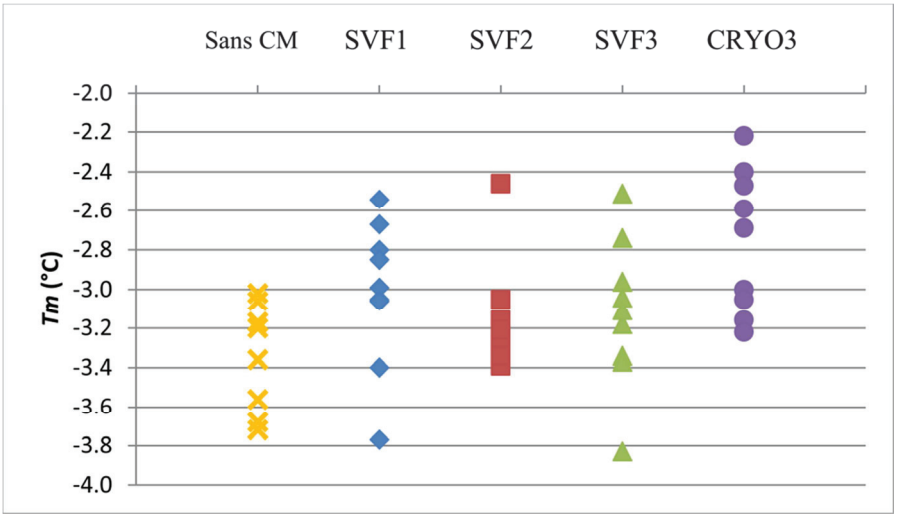



**Figure 18 : Diagramme des valeurs de $T_m$ des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins**

Concernant $\Delta H$, la solution contenant du SVF1 a été la plus stable avec huit des neuf valeurs comprises entre 180,29 $J.g^{-1}$ et 182,16 $J.g^{-1}$ (Figure 19). Néanmoins, à l'instar du SVF2 pour $T_m$, la neuvième valeur était assez éloignée (174,00 $J.g^{-1}$). La solution contenant du SVF2 a engendré plus de variations mais les valeurs étaient uniformément réparties entre 174,06 $J.g^{-1}$ et 186,62 $J.g^{-1}$. Enfin les variations les plus importantes ont été observées avec la solution contenant du SVF3. Bien que huit des neuf valeurs étaient réparties relativement uniformément entre 175,84 $J.g^{-1}$ et 184,40 $J.g^{-1}$, la neuvième valeur semblait aberrante (158,65 $J.g^{-1}$). On peut cependant remarquer que lorsque cette valeur est écartée, la distribution des huit autres est similaire à celle des valeurs obtenues avec la solution contenant du SVF1.

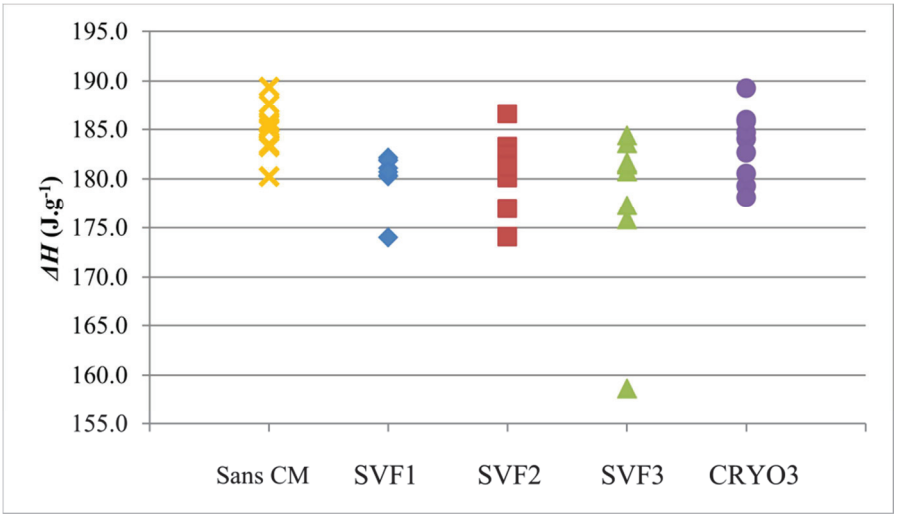



**Figure 19 : Diagramme des valeurs de $\Delta H$ des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins**

Selon nos critères et dans nos conditions expérimentales (poids des échantillons, vitesses de refroidissement et de réchauffement… etc.), deux SVF pouvaient être considérés comme stables d'un point de vue thermodynamique : les SVF1 ($\Delta H$) et SVF2 ($T_m$). Cependant, la solution contenant du SVF1 était aussi la plus stable pour $T_c$ (Figure 20). En conséquence, le SVF1 a été choisi comme référence pour l'ensemble de l'approche biologique.

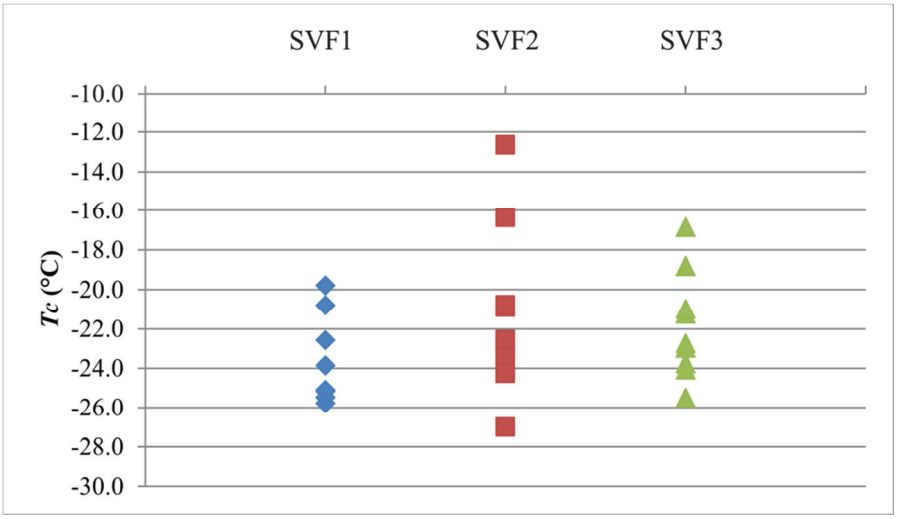



**Figure 20 : Diagramme des valeurs de $T_c$ des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins contenant du SVF**

### *b) Impact des différents SVF sur les propriétés thermodynamiques des solutions de cryoconservation*

L'impact des SVF sur les propriétés thermodynamiques des solutions de cryoconservation a été différent suivant que l'on considère les valeurs moyennes des caractéristiques ou les distributions des valeurs obtenues.

Tout d'abord, les SVF ont eu un impact relativement faible sur les valeurs moyennes de $T_m$ ou de $\Delta H$ (Tableau 9). Concernant $T_m$, les valeurs moyennes ont ainsi légèrement augmenté suite à l'ajout de SVF dans les solutions de cryoconservation. Les SVF2 et SVF3 ont eu une influence plus faible que le SVF1. En effet, 0,18°C et 0,21°C séparaient la valeur moyenne obtenue avec la solution contrôle sans composé macromoléculaire de celles obtenues avec les solutions contenant du SVF2 ou du SVF3 respectivement, contre 0,32°C pour la solution contenant du SVF1.

En ce qui concerne $\Delta H$, l'ajout de SVF a provoqué une légère baisse des valeurs moyennes obtenues avec les solutions de cryoconservation. En effet, entre 4,24 $J.g^{-1}$ et 6,70 $J.g^{-1}$ séparaient la valeur moyenne obtenue avec la solution contrôle de celles obtenues avec les solutions contenant du SVF.

A l'inverse, les SVF ont eu une influence variable sur les distributions des valeurs de $T_m$ et $\Delta H$ obtenues avec les solutions de cryoconservation.

Concernant $T_m$, tous les SVF ont eu tendance à augmenter la variabilité des résultats (Figure 18). Les variations obtenues avec la solution contenant du SVF2 (0,93°C) étaient ainsi proches de celles obtenues avec la solution contrôle (0,70°C). Les variations obtenues avec les solutions contenant du SVF1 ou du SVF3 étaient quant à elles plus importantes (1,23°c et 1,32°C respectivement).

En ce qui concerne $\Delta H$, les variations obtenues avec la solution contenant du SVF1 (8,16 $J.g^{-1}$) étaient similaires à celles obtenues avec la solution contrôle (9,13 $J.g^{-1}$) (Figure 19). Celles obtenues avec la solution contenant du SVF2 (12,56 $J.g^{-1}$) étaient légèrement plus importantes. Les variations les plus importantes ont été observées avec la solution contenant du SVF3 (25,75 $J.g^{-1}$). On peut cependant remarquer que si la valeur aberrante était écartée, les variations (8,56 $J.g^{-1}$) étaient similaires à celles obtenues avec les solutions contrôle ou contenant du SVF1.

### *c) Caractéristiques thermodynamiques des solutions contenant 18% de CRYO3 et comparaison avec les SVF*

Les valeurs moyennes de $T_m$ et $\Delta H$ étaient similaires entre toutes les solutions de cryoconservation contenant un SVF. En conséquence, toutes les valeurs obtenues avec ces solutions ont été mises en commun afin de calculer les moyennes globales de $T_m$ et $\Delta H$ pour l'ensemble des solutions contenant un SVF. Ces moyennes globales ont été comparées aux valeurs moyennes obtenues avec la solution contenant du CRYO3.

Les caractéristiques thermodynamiques de cette dernière étaient relativement proches de celles des solutions contenant un SVF. En ce qui concerne $T_m$, les valeurs obtenues avec la solution contenant du CRYO3 étaient comprises entre -2,22°C et -3,22°C (Figure 18). Bien que légèrement différentes, ces valeurs se situaient dans le même ordre de grandeur que celles obtenues avec les solutions contenant un SVF en prenant en compte l'incertitude expérimentale. De plus, les variations obtenues avec la solution contenant du CRYO3 (1,00°C) étaient similaires à celles obtenues avec la solution contenant du SVF2 (solution la plus stable). Elles étaient également légèrement inférieures à celles obtenues avec les autres

solutions contenant un SVF. Enfin, 0,34°C séparaient la valeur moyenne de $T_m$ obtenue avec la solution contenant du CRYO3 de la valeur moyenne globale obtenue avec l'ensemble des solutions contenant du SVF (Tableau 9).

Les valeurs de $\Delta H$ obtenues avec la solution contenant du CRYO3 étaient réparties uniformément entre 178,14 $J.g^{-1}$ et 189,26 $J.g^{-1}$ (Figure 19). Ces valeurs étaient également proches de celles obtenues avec l'ensemble des solutions contenant un SVF. Les variations obtenues avec la solution contenant du CRYO3 (11,12 $J.g^{-1}$) étaient cependant : *(i)* légèrement supérieures à celles obtenues avec la solution contenant du SVF1 (solution la plus stable), *(ii)* similaires à celles obtenues avec la solution contenant du SVF2 et *(iii)* inférieures à celles obtenues avec la solution contenant du SVF3. Enfin, seuls 3,50 $J.g^{-1}$ séparaient la valeur moyenne de $\Delta H$ obtenue avec la solution contenant du CRYO3 et la valeur moyenne globale obtenue avec l'ensemble des solutions contenant du SVF (Tableau 9).

En ce qui concerne son influence sur les propriétés thermodynamiques des solutions de cryoconservation, le CRYO3 a augmenté légèrement la variabilité des résultats, qu'il s'agisse de $T_m$ ou de $\Delta H$ (Figure 18 et Figure 19). De plus, l'addition de CRYO3 a provoqué une augmentation sensible de la valeur moyenne de $T_m$. En effet, 0,57°C séparaient les valeurs moyennes obtenues avec la solution contenant du CRYO3 et la solution contrôle. A l'inverse, le CRYO3 n'a pas eu d'influence sur la valeur moyenne de $\Delta H$ des solutions. Seuls 1,67 $J.g^{-1}$ séparaient en effet les valeurs moyennes de $\Delta H$ obtenues avec la solution contenant du CRYO3 et la solution contrôle.

## 2. Solutions pour embryons bovins produits *in vitro*

Les valeurs moyennes de $T_m$ obtenues avec les solutions contenant du CRYO3, de la BSA ou du SVF étaient similaires (Tableau 10). En effet, la différence la plus importante était égale à 0,23°C et a été observée entre la solution contenant du SVF et celle contenant de la BSA. La valeur moyenne obtenue avec la solution contenant du CRYO3 était quant à elle séparée par seulement 0,08°C et 0,15°C de celles obtenues avec les solutions contenant de la BSA ou du SVF respectivement.

**Tableau 10 : Caractéristiques thermodynamiques des solutions de cryoconservation pour embryons bovins produits *in vitro* (moyenne ± SD)**

| | $T_m$ (°C) | $\Delta H$ ($J.g^{-1}$) |
|---|---|---|
| Solution IMV (4 $g.l^{-1}$ BSA + 1,5M EG) + 0,1M Sac[a] (n = 9) | -3,48 ± 0,22 | 181,95 ± 2,74 |
| D-PBS + 1,5M EG + 0,1M Sac + 20% SVF (n = 9) | -3,25 ± 0,20 | 186,61 ± 1,73 |
| D-PBS + 1,5M EG + 0,1M Sac + 20% CRYO3 (n = 9) | -3,33 ± 0,41 | 187,16 ± 2,22 |

[a] : saccharose

En revanche, la distribution des valeurs de $T_m$ obtenues avec la solution contenant du CRYO3 était plus étendue que celles obtenues avec les solutions contenant de la BSA ou du SVF (Figure 21). Ces deux dernières avaient des distributions similaires. La variabilité des résultats obtenus avec la solution contenant du CRYO3 (1,17°C) était donc plus importante que celles obtenues avec les solutions contenant de la BSA ou du SVF (0,64°C et 0,57°C respectivement).

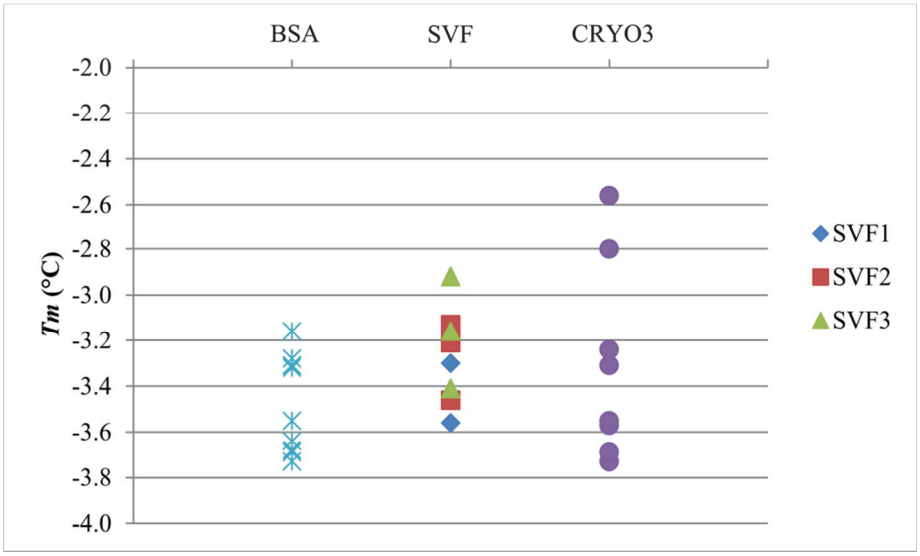



**Figure 21 : Diagramme des valeurs de $T_m$ des solutions de cryoconservation pour embryons bovins produits *in vitro***

En ce qui concerne $\Delta H$, les propriétés thermodynamiques obtenues avec les solutions contenant du CRYO3 ou du SVF étaient similaires. Leurs valeurs moyennes n'étaient ainsi séparées que de 0,55 $J.g^{-1}$ (Tableau 10). De même, les distributions de leurs valeurs étaient semblables avec des valeurs comprises entre 183,75 $J.g^{-1}$ et 189,48 $J.g^{-1}$ pour la solution contenant du CRYO3 et entre 183,86 $J.g^{-1}$ et 188,33 $J.g^{-1}$ pour les solutions contenant du SVF (Figure 22). Enfin, les variabilités de leurs résultats étaient proches (4,54 $J.g^{-1}$ pour la solution contenant du SVF et 5,73 $J.g^{-1}$ pour la solution contenant du CRYO3).

A l'inverse, les valeurs de $\Delta H$ obtenues avec la solution contenant de la BSA étaient relativement différentes de celles obtenues avec les deux autres solutions. Elles étaient ainsi comprises entre 176,08 $J.g^{-1}$ et 184,39 $J.g^{-1}$. En conséquence, 4,66 $J.g^{-1}$ et 5,21 $J.g^{-1}$ séparaient la valeur moyenne obtenue avec la solution contenant de la BSA de celles obtenues avec les solutions contenant du SVF et du CRYO3 respectivement. De même, la variabilité des résultats obtenus avec la solution contenant de la BSA (8,31 $J.g^{-1}$) était supérieure à celles obtenues avec les autres solutions.

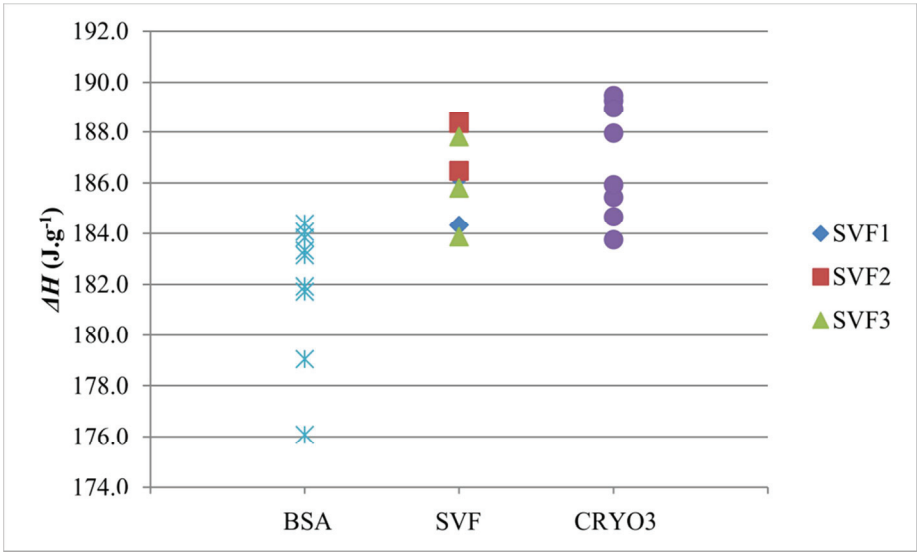



**Figure 22 : Diagramme des valeurs de $\Delta H$ des solutions de cryoconservation pour embryons bovins produits *in vitro***

### 3. Solutions utilisées lors de l'approche *in vivo*

L'évaluation thermodynamique des solutions utilisées lors de l'approche *in vivo* a montré que les propriétés physiques moyennes des solutions utilisées dans la première expérimentation *in vivo* étaient très proches de celles des solutions de composition identique étudiées dans l'approche thermodynamique de la première partie (Tableau 11). Cette similarité a permis de valider la combinaison entre une approche thermodynamique et une approche biologique.

En ce qui concerne les solutions utilisées lors de la deuxième expérimentation, leurs propriétés thermodynamiques moyennes étaient très proches entre elles mais légèrement différentes des solutions précédemment testées.

**Tableau 11 : Propriétés thermodynamiques des solutions utilisées lors de l'approche *in vivo* (moyenne ± SD)**

| | | $T_m$ (°C) | $\Delta H$ (J.g$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| Première expérimentation | D-PBS + 10% DMSO + 18% SVF1 (n = 3) | -3,36 ± 0,74 | 184,03 ± 4,84 |
| | D-PBS + 10% DMSO + 18% CRYO3 (n = 3) | -2,70 ± 0,87 | 182,27 ± 7,83 |
| Deuxième expérimentation | « IMV holding medium » + 10% DMSO (n = 3) | -3,83 ± 0,41 | 169,21 ± 6,62 |
| | CRYO3 + 10% DMSO (n = 3) | -3,83 ± 0,50 | 161,51 ± 6,93 |

## B. Evaluation biologique

### 1. Evaluation *in vitro*

Cent cinquante-deux embryons de lapins ont été congelés durant l'étude *in vitro*. Après décongélation, seuls trois embryons de chaque groupe présentaient des altérations morphologiques (manteau muqueux endommagé ou présentant des inclusions). Après culture *in vitro*, le taux de survie embryonnaire obtenu dans le groupe CRYO3 (73,7% ; 56/76) était proche de celui obtenu dans le groupe SVF (77,6% ; 59/76). Aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes ($p$ = 0,71).

Concernant les embryons de bovins, aucune différence n'a été observée entre la solution contenant de la BSA et la solution contenant du SVF, que ce soit pour le taux de survie embryonnaire après 48 h (42,2% et 58 % respectivement, $p$ = 0,15) ainsi que les taux d'éclosion après 24 h (4,4% et 10,0% respectivement, $p$ = 0,44), 48 h (26,7% et 22,0% respectivement, $p$ = 0,64) et 72 h (31,1% et 36,0% respectivement, $p$ = 0,67) (Tableau 12).

**Tableau 12 : Taux de survie et d'éclosion après congélation, décongélation puis culture *in vitro* d'embryons bovins produits *in vitro***

| | Taux de survie à 48 h (%) | Taux d'éclosion (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| Groupe BSA | 42,2%$^{b}$ (19/45) | 4,4%$^{z}$ (2/45) | 26,7%$^{z}$ (12/45) | 31,1%$^{b}$ (14/45) |
| Groupe SVF | 58,0%$^{b}$ (29/50) | 10,0% (5/50) | 22,0%$^{b}$ (11/50) | 36,0%$^{b}$ (18/50) |
| Groupe CRYO3 | 81,5%$^{a}$ (44/54) | 16,7%$^{y}$ (9/54) | 44,4%$^{a,y}$ (24/54) | 61,1%$^{a}$ (33/54) |

Des lettres différentes (a, b) au sein d'une colonne représentent une différence significative ($p$ < 0,05). Des lettres différentes (y, z) au sein d'une colonne représentent une différence au seuil de 10% ($p$ < 0,10).

En revanche, le taux de survie embryonnaire obtenu dans le groupe CRYO3 après 48 h (81,5%) était supérieur à ceux obtenus dans le groupe BSA ($p$ = 0,00006) et dans le groupe SVF ($p$ = 0,011). De la même manière, le taux d'éclosion obtenu dans le groupe CRYO3 après 72 h (61,1%) était supérieur à ceux obtenus dans le groupe BSA ($p$ = 0,0045) et le groupe SVF ($p$ = 0,012). De plus, les embryons du groupe CRYO3 ont éclos plus rapidement que ceux du groupe SVF et tendaient à éclore plus rapidement que ceux du groupe BSA. En effet, le taux d'éclosion à 48 h du groupe CRYO3 (44,4%) était supérieur à celui du groupe SVF à 48 h (22,0%, $p$ = 0,022). De même, les taux d'éclosion du groupe CRYO3 à 24 et 48 h (16,7% et 44,4% respectivement) étaient supérieurs au seuil de 10% à ceux du groupe BSA à 24 et 48 h (4,4% et 26,7% respectivement, $p$ = 0,063 et $p$ = 0,093 respectivement).

Pour les résultats significativement différents, la puissance des tests statistiques était comprise entre 0,81 et 0,98. Nous en avons conclu que la puissance de l'étude était suffisante pour tirer des conclusions.

### 2. Evaluation *in vivo*

Durant chaque expérimentation, une femelle n'a pas pu mener sa gestation à terme et n'a pas été prise en compte dans le calcul des résultats.

Lors de la première expérimentation, 238 embryons ont été transférés. Seuls quatre embryons du groupe SVF et huit embryons du groupe CRYO3 présentaient des altérations morphologiques après décongélation. Néanmoins, les résultats obtenus avec les solutions utilisées pour l'évaluation *in vitro* n'ont pas été bons. Le taux de mise bas, le taux total de naissance et le taux de naissance de lapereaux vivants étaient ainsi respectivement de 25%, 5,8% et 4,2% pour le groupe SVF et de 18,2%, 3,6% et 2,7% pour le groupe CRYO3. Les mauvais résultats obtenus avec la solution de référence semblent montrer qu'un problème extérieur aux caractéristiques des solutions de congélation a perturbé l'expérimentation. En conséquence, aucune analyse statistique n'a été effectuée.

Lors de la deuxième expérimentation, 363 embryons ont été transférés et les résultats obtenus ont été meilleurs. En effet, seuls dix embryons du groupe BSA et quatre embryons du groupe CRYO3/100 étaient endommagés morphologiquement après décongélation. De même, le taux de mise bas, le taux total de naissance et le taux de naissance de lapereaux vivants étaient respectivement de 82,4%, 35,1% et 28% pour le groupe BSA et de 75%, 34,1% et 28,6% pour le groupe CRYO3/100. La comparaison des différents taux n'a mis en évidence aucune différence entre les deux groupes ($p$ = 0,69, $p$ = 0,91 et $p$ = 0,91 respectivement).

## III. Discussion

Cette étude rapporte la combinaison d'une approche physique et d'une approche biologique permettant la caractérisation de solutions de congélation lente pour embryons de mammifères dans le but d'évaluer un substituant aux produits d'origine animale. Le nombre de tests réalisés pour chaque caractérisation thermodynamique (n = 9) était supérieur au nombre classiquement utilisé lors d'évaluations par DSC (n = 3). Nous pensons donc que les caractéristiques physiques des solutions ici rapportées sont représentatives de leur comportement thermodynamique.

## *A. Variabilité des résultats thermodynamiques*

Malgré toutes les précautions prises dans le protocole expérimental pour rendre les mesures les plus reproductibles possible, la variabilité des résultats thermodynamiques obtenus avec les solutions testées était supérieure à l'incertitude de mesure du DSC.

### 1. Origine de cette variabilité

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées afin d'expliquer l'existence de cette variabilité. Une première concerne la sensibilité des échantillons aux conditions atmosphériques et en particulier au taux d'humidité ambiant. En effet, le volume des échantillons utilisés dans le DSC Diamond est de l'ordre du microlitre. La présence de composés hygroscopiques dans les solutions, associée à ce faible volume, rend les échantillons particulièrement sensibles à l'humidité ambiante. Une variation du taux d'humidité et/ou de la durée d'exposition de l'échantillon à cette humidité pourrait conduire à une dilution plus ou moins importante de la solution de départ, ce qui pourrait engendrer une variabilité des résultats. Ce phénomène semble toutefois avoir un impact limité dans la mesure où les conditions de préparation des échantillons (ouverture des flacons après retour de la solution à température ambiante et juste avant le pipetage, grande vitesse de préparation des échantillons, réalisation des mesures sur une durée inférieure à trois semaines… etc.) ont été élaborées de manière à minimiser son influence.

Une deuxième hypothèse concerne la reproductibilité de l'analyse des thermogrammes. En effet, cette analyse est effectuée via un logiciel informatique mais nécessite l'intervention d'un expérimentateur afin de définir les différents repères permettant la mesure des grandeurs thermodynamiques (Figure 10). Une variabilité dans la définition de ces repères engendrerait donc une variabilité des résultats. Ce phénomène est en particulier présent lors de la mesure de $\Delta H$. En effet, un zoom plus ou moins important sur le pic de cristallisation peut provoquer une variation de la ligne de base servant à la mesure de l'aire du pic et ainsi une variation de la valeur de $\Delta H$ mesurée. Mais à l'instar des conditions atmosphériques, cette hypothèse semble avoir un impact limité, voire nul, et ce pour deux raisons. D'une part, l'analyse des thermogrammes a toujours été réalisée par la même personne éliminant ainsi la possibilité d'un facteur expérimentateur. D'autre part, cette personne a mis en place une systématisation de l'analyse des thermogrammes qui a permis de standardiser leur lecture, ce qui était particulièrement important pour les valeurs de $\Delta H$. Les erreurs de lecture ont ainsi été supprimées.

Enfin, une dernière hypothèse proposée par Salvetti et al. concerne la composition même des échantillons [Salvetti et al., 2006]. En effet, les solutions de cryoconservation sont des solutions relativement complexes, en particulier lorsqu'elles contiennent du SVF. Le volume des échantillons étant faible, un défaut d'homogénéisation de la solution avant préparation de l'échantillon pourrait engendrer une hétérogénéité des échantillons testés et donc une variabilité des résultats. Bien que les solutions aient été systématiquement ré-homogénéisées après retour de la solution à température ambiante et avant pipetage, cette hypothèse est de notre point de vue l'hypothèse la plus plausible. En effet, dans l'étude sur la caractérisation des solutions pour embryons de lapins, l'ajout d'un composé macromoléculaire (SVF ou CRYO3) a eu pour conséquence une augmentation plus ou moins importante de la variabilité des résultats par rapport à celle obtenue avec la solution sans composé macromoléculaire. Cette augmentation pourrait être expliquée par une augmentation de la complexité des solutions et donc du risque d'hétérogénéité des échantillons.

## 2. Conséquences biologiques de cette variabilité

A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'évaluation de l'impact biologique de cette variabilité. Cet impact demeure donc incertain. Néanmoins, il est probablement non négligeable.

D'une part, la différence maximale observée entre la valeur la plus haute et la valeur la plus basse de $T_m$ était de 1,4°C pour une solution donnée (solutions pour embryons de lapins contenant du SVF1 ou du SVF3). Or comme rappelé précédemment, $T_m$ est la température en dessous de laquelle la glace peut se former dans une solution. En conséquence, une variation de $T_m$ conduit à une variation de la zone de surfusion, ce qui engendre des conséquences sur l'état de la solution à une température donnée, en particulier à celle du « seeding ». L'état de surfusion est un des facteurs les plus importants déterminant la morphologie de la glace extracellulaire [Searles et al., 2001; Gosden et al., 2010]. Gosden a ainsi observé qu'une variation de seulement 3°C dans l'état de surfusion au moment de la cristallisation engendre des modifications de la structure de la glace. Une différence de 1,4°C pourrait donc avoir des effets similaires, bien qu'atténués. En tenant en plus compte du fait qu'un état de surfusion peut également être à l'origine de la formation de glace intracellulaire, une variabilité de 1,4°C de $T_m$ pourrait donc avoir un effet biologique.

D'autre part, comme expliqué précédemment, $\Delta H$ peut être utilisée afin de calculer $Q_{max}$ obtenue pour un échantillon donné, qui est proche de la quantité maximale de glace formée dans une solution, exprimée en pourcentage ($w.w^{-1}$) [Boutron, 1984]. Une différence dans la quantité de glace extracellulaire pourrait avoir une influence sur les dommages structuraux engendrés aux embryons lors d'un processus de congélation. En excluant la valeur aberrante de $\Delta H$ obtenue avec une solution pour embryons de lapins, l'écart maximal observé entre la valeur la plus haute et la valeur la plus basse de $Q_{max}$ était de 4% pour une solution donnée (solution pour embryons de lapins contenant du SVF2). L'impact potentiel de cette différence reste incertain. Néanmoins, cette question semble d'autant plus pertinente qu'une valeur aberrante a été mesurée avec la solution pour embryons de lapins contenant du SVF3.

Une étude est actuellement en cours afin d'essayer d'évaluer de manière plus précise l'impact biologique des différences de variabilités thermodynamiques observées entre les solutions de cryoconservation contenant différents SVF. Pour ce faire, des embryons de lapins ont été congelés dans trois solutions composées de D-PBS, de 10% de DMSO et de 18% de l'un des trois SVF. Après décongélation, les taux de survie seront évalués par culture *in vitro*, ce qui pourrait permettre de donner quelques éléments de réponse sur cet impact biologique.

### *B. Influence de différents SVF sur les propriétés thermodynamiques de solutions de cryoconservation*

Lors de l'évaluation thermodynamique des solutions pour embryons de lapins, les différentes solutions contenant un SVF avaient des caractéristiques moyennes similaires mais les variabilités des résultats étaient différentes. Du fait des différences d'origine, de composition et de procédés industriels appliqués aux trois SVF testés, seules des hypothèses ont pu être proposées pour expliquer ces observations.

Tout d'abord, les valeurs moyennes de $T_m$ et $\Delta H$ étaient similaires entre les trois solutions contenant un SVF, et ce, malgré leurs différences de composition (données fournies par les laboratoires). L'écart maximal observé entre les valeurs moyennes de $T_m$ et $\Delta H$ était, en effet, compris dans l'incertitude de mesure du DSC (±0,11°C pour $T_m$ et ±1,14% pour $\Delta H$). Les valeurs moyennes ont donc été considérées comme équivalentes, dans nos conditions expérimentales, pour l'ensemble des solutions contenant un SVF. L'origine de cette similitude

pourrait être le faible volume de SVF (18%) présent dans les solutions. La dilution des variations de composition aurait, en effet, pu limiter leur impact. Cette hypothèse est renforcée par la faible influence des SVF sur les propriétés thermodynamiques des solutions de cryoconservation. L'ajout de SVF dans les solutions de cryoconservation a ainsi provoqué des variations de $T_m$ et $\Delta H$ comprises ou seulement légèrement supérieures à l'incertitude du DSC. Ces observations suggèrent donc que les variations de composition entre différents SVF ont un impact limité sur les propriétés thermodynamiques moyennes obtenues avec des solutions de congélation ne contenant que 18% de SVF.

Il est par ailleurs intéressant de remarquer que l'addition de SVF dans les solutions de cryoconservation a eu une influence différente sur les valeurs moyennes de $T_m$ et $\Delta H$ (augmentation de $T_m$ et diminution de $\Delta H$). L'influence des SVF sur les propriétés physiques des solutions ne peut donc pas être expliquée uniquement par une variation de la concentration en cryoprotecteurs suite à leur ajout. En effet, dans le cas d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration en cryoprotecteurs, $T_m$ et $\Delta H$ auraient normalement évolué dans le même sens. Des interactions entre les différents composants des SVF et les cristaux de glace semblent donc jouer un rôle dans les variations de $T_m$ et $\Delta H$.

Concernant $\Delta H$, une hypothèse simple peut être proposée pour expliquer la diminution observée. Les SVF sont des produits complexes composés d'eau et de nombreuses molécules. La quantité d'eau présente dans un volume donné de SVF est donc inférieure à celle présente dans un volume identique de D-PBS. En conséquence, les solutions contenant un SVF possédaient une quantité d'eau légèrement inférieure à celle présente dans la solution contrôle. Cette différence a pu être à l'origine d'une diminution de la quantité d'eau cristallisée et donc de $\Delta H$.

Cependant, cette explication ne peut pas s'appliquer à l'évolution de $T_m$. En effet, une diminution de la quantité d'eau présente dans les solutions est également synonyme d'une augmentation de la concentration en cryoprotecteurs. $T_m$ aurait donc également dû diminuer. D'autres facteurs, non identifiés à ce jour, jouent donc sans doute un rôle dans la cinétique de formation de la glace et sa fusion. Il a été observé que les interactions entre les différents composés d'une solution de cryoconservation semblent jouer un rôle dans le comportement thermodynamique des solutions [Salvetti et al., 2006]. Il semble donc possible d'envisager que certains composés présents dans les SVF puissent interagir avec la formation et la fonte des cristaux de glace. Les SVF sont en effet des mélanges complexes comportant un grand nombre de constituants dont certains ne sont pas identifiés [Ménézo et Khatchadourian, 1986; Horvath et Seidel, 2006; Rauch et al., 2011]. Les interactions entre ces composants, les cryoprotecteurs et la formation de glace sont encore mal compris. Mais il est possible que les différents composants d'un SVF puissent interférer avec le phénomène de fusion de la glace et ainsi avec sa température de fin de fusion dans la solution cryoprotectrice.

Bien que leurs propriétés moyennes soient similaires, des différences ont été observées dans la variabilité des résultats obtenus avec des solutions contenant un SVF. Cette variabilité explique, d'ailleurs, leur influence respective sur la variabilité des solutions de cryoconservation. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces différences de variabilité. D'une part, nous avons déjà émis l'hypothèse qu'une partie de la variabilité des résultats thermodynamiques étaient due à un défaut d'homogénéisation des solutions avant les tests. Les SVF testés pourraient avoir une influence différente sur l'homogénéité des solutions, ce qui pourrait engendrer des différences dans la variabilité des résultats. Néanmoins, cette hypothèse n'explique pas pourquoi le même SVF n'a pas été le plus stable pour $T_m$ et pour $\Delta H$. L'hypothèse d'une interaction des différents composants d'un SVF avec le processus de nucléation ou avec le phénomène de croissance de la glace pourrait donc

également s'appliquer ici. La variabilité des résultats observée pourrait ainsi être engendrée par l'origine des SVF aussi bien que par les procédés industriels qui leur sont appliqués.

### *C. Comparaison des propriétés thermodynamiques des solutions utilisées comme références*

Durant l'expérimentation thermodynamique, plusieurs solutions contenant un SVF ou de la BSA ont été utilisées comme références. Comme vu précédemment, les caractéristiques thermodynamiques moyennes des solutions contenant un SVF étaient similaires lors de l'étude sur les embryons de lapins. Cette similitude n'a cependant pas été observée lors de l'étude sur les embryons bovins produits *in vitro*. En effet, en dépit de taux de survie et d'éclosion similaires dans le groupe SVF et dans le groupe BSA, les propriétés thermodynamiques obtenues avec les solutions contenant un SVF étaient différentes de celles obtenues avec la solution contenant de la BSA. Se pose alors la question de l'origine de cette inadéquation entre les comparaisons biologiques et thermodynamiques.

Avant toute tentative d'explication, il est nécessaire de noter que seul le SVF1 a été utilisé lors de l'évaluation biologique alors que trois SVF différents ont été utilisés lors de l'évaluation thermodynamique. La solution pour embryons de bovins contenant du SVF1 pourrait donc avoir des propriétés thermodynamiques équivalentes à la solution contenant de la BSA, la différence observée étant due aux solutions contenant du SVF2 ou du SVF3. Ceci n'est pas le cas dans la mesure où les propriétés thermodynamiques moyennes et les distributions des valeurs obtenues avec les trois solutions contenant un SVF étaient très proches (Tableau 13 ; Figure 21 et Figure 22). Plus particulièrement, seuls 0,08°C et 0,34 $J.g^{-1}$ séparaient les valeurs moyennes de $T_m$ et de $\Delta H$ obtenues avec la solution contenant du SVF1 de celles obtenues après la mise en commun de l'ensemble des solutions contenant un SVF.

**Tableau 13 : Caractéristiques thermodynamiques des solutions de cryoconservation pour embryons de bovins contenant un SVF (moyenne ± SD)**

| | $T_m$ (°C) | $\Delta H$ ($J.g^{-1}$) |
|---|---|---|
| D-PBS + 1,5M EG + 0,1M Sac[a] + 20% SVF1 (n = 3) | -3,33 ± 0,21 | 186,27 ± 1,99 |
| D-PBS + 1,5M EG + 0,1M Sac[a] + 20% SVF2 (n = 3) | -3,27 ± 0,17 | 187,73 ± 1,09 |
| D-PBS + 1,5M EG + 0,1M Sac[a] + 20% SVF3 (n = 3) | -3,16 ± 0,25 | 185,82 ± 1,98 |
| Mise en commun des solutions contenant un SVF (n = 9) | -3,25 ± 0,20 | 186,61 ± 1,73 |

[a] : saccharose

En conséquence, une inadéquation est effectivement présente entre les comparaisons des propriétés biologiques et thermodynamiques des solutions pour embryons bovins contenant un SVF ou de la BSA. Une explication serait que des propriétés biologiques équivalentes puissent être obtenues avec des solutions présentant des propriétés thermodynamiques légèrement différentes mais comprises dans une gamme de valeurs donnée. Plusieurs éléments sont en faveur de cette hypothèse. D'une part, bien que les différentes valeurs de $\Delta H$ obtenues avec les solutions pour embryons bovins contenant un SVF ou de la BSA soient différentes, elles étaient relativement proches. L'écart entre leurs valeurs moyennes (4,66 $J.g^{-1}$) était ainsi très légèrement supérieur à la variabilité obtenue avec la solution la plus stable (4,54 $J.g^{-1}$) et était inférieur à toutes les autres variabilités. D'autre part, les distributions des valeurs obtenues avec ces solutions se chevauchaient (Figure 23). Enfin, lors de la mise en commun de ces valeurs, leur distribution était équivalente à celle obtenue avec les solutions de cryoconservation pour embryons de lapins contenant un SVF. De même, la variabilité obtenue après mise en commun des valeurs (8,32 $J.g^{-1}$) était

équivalente à celle obtenue avec la solution pour embryons de lapins la plus stable (solution contenant du SVF1) et était inférieure à celle obtenue avec les solutions contenant du SVF2 ou du SVF3.

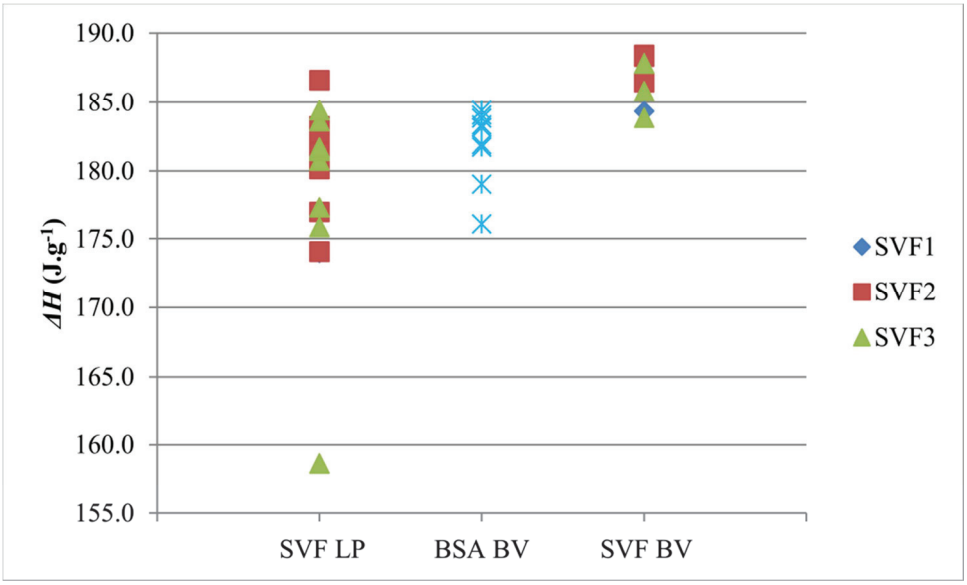



**Figure 23 : Diagramme des valeurs de Δ*H* des solutions de cryoconservation utilisées comme référence**
SVF LP : Solutions de cryoconservation pour embryons de lapins contenant un SVF
BSA BV: Solution de cryoconservation pour embryons de bovins contenant de la BSA
SVF BV : Solutions de cryoconservation pour embryons de bovins contenant un SVF

Ces observations nous amènent à la comparaison des valeurs obtenues avec l'ensemble des solutions de référence. En effet, les valeurs de $T_m$ et $\Delta H$ obtenues avec les solutions de références pour embryons de lapins et de bovins produits *in vitro* se situaient toutes dans le même ordre de grandeur. Les valeurs de $T_m$ étaient ainsi comprises entre -2,46°C et -3,83°C tandis que les valeurs de $\Delta H$ étaient comprises entre 174,00 $J.g^{-1}$ et 188,40 $J.g^{-1}$ (en excluant la valeur aberrante). Il est possible que ces valeurs soient représentatives des propriétés thermodynamiques qui pourraient être obtenues avec d'autres solutions classiquement utilisées pour la cryoconservation d'embryons de mammifères. Elles pourraient donc être utilisées comme références lors d'études ultérieures.

Les valeurs obtenues avec les solutions utilisées comme références lors de l'étude *in vivo* n'ont volontairement pas été prises en compte dans ces valeurs de référence. Ces solutions n'ont en effet pas été fabriquées et conservées dans les mêmes conditions que les solutions testées lors de l'approche thermodynamique proprement dite. Le DSC étant un appareil extrêmement précis et sensible, il nous a semblé plus prudent de ne pas garder ces valeurs comme références afin de conserver une bonne standardisation et une bonne reproductibilité de nos comparaisons. Ces différences de fabrication et de conservation pourraient également être à l'origine de la légère différence observée entre leurs valeurs moyennes et celles obtenues avec les solutions étudiées lors de l'étude thermodynamique proprement dite.

## *D. Comparaison du CRYO3 et des composés d'origine animale*

### 1. Approche thermodynamique

Lors de l'approche thermodynamique, les caractéristiques des solutions contenant du CRYO3 ont été similaires à celles des solutions contenant la même concentration volumique de SVF.

En ce qui concerne les solutions pour embryons de lapins, les valeurs de $T_m$ et de $\Delta H$ obtenues avec la solution contenant du CRYO3 se situaient dans le même ordre de grandeur que celles obtenues avec les solutions contenant du SVF. La différence entre leurs valeurs moyennes était ainsi comprise ($\Delta H$) ou légèrement supérieure ($T_m$) à l'incertitude de mesure du DSC. De plus, ces deux différences étaient inférieures à la plus faible variabilité des résultats obtenue pour une solution donnée (0,57°C pour $T_m$ et 4,54 $J.g^{-1}$ pour $\Delta H$). Par ailleurs, la variabilité des résultats obtenue avec la solution contenant du CRYO3 était similaire ($T_m$) ou seulement légèrement supérieure ($\Delta H$) aux variabilités les plus faibles obtenues avec les solutions contenant un SVF. Il faut souligner qu'à l'inverse des solutions contenant un SVF, aucune valeur aberrante n'a été mesurée avec la solution contenant du CRYO3.

De même, la solution pour embryons bovins contenant du CRYO3 possédait des propriétés thermodynamiques similaires à celles de la solution pour embryons bovins contenant du SVF à l'exception de la variabilité des valeurs de $T_m$. La différence entre leurs valeurs moyennes de $T_m$ et $\Delta H$ était ainsi comprise dans l'incertitude de mesure du DSC.

L'ensemble de ces résultats suggère que le CRYO3 possède des propriétés thermodynamiques similaires au SVF lorsque les deux sont utilisés dans les mêmes proportions, avec le même tampon de base et les mêmes cryoprotecteurs. Comme vu précédemment, l'utilisation de 18% de SVF a très peu d'influence sur les propriétés thermodynamiques des solutions de cryoconservation. Le CRYO3 ayant été utilisé aux mêmes concentrations, il serait donc logique de penser que les faibles écarts observés entre les solutions contenant du CRYO3 ou du SVF sont dus au faible impact de ces derniers sur les propriétés physiques des solutions. Néanmoins, on peut également remarquer que la solution utilisée lors de l'approche *in vivo* et contenant uniquement du CRYO3 et 10% de DMSO possédait également des propriétés proches des solutions contenant 18% ou 20% de SVF. Et bien que cette solution ait été fabriquée et conservée dans des conditions différentes, il semble raisonnable de penser que la faible concentration de CRYO3 n'est pas seule responsable de la similarité des propriétés thermodynamiques observée. La composition du CRYO3 permet sans doute également l'obtention de caractéristiques proches de celles de solutions composées d'un tampon et d'un produit d'origine animale.

Les valeurs de $T_m$ obtenues avec les solutions de cryoconservation pour embryons bovins contenant du CRYO3 ou de la BSA étaient similaires. De plus, malgré la différence observée, les valeurs de $\Delta H$ obtenues avec ces solutions étaient relativement proches. Les arguments employés lors de la comparaison entre les solutions pour embryons bovins contenant du SVF et de la BSA sont encore valables ici. En particulier, l'écart entre les valeurs moyennes de $\Delta H$ obtenues avec les solutions pour embryons bovins contenant du CRYO3 ou de la BSA (5,21 $J.g^{-1}$) était très légèrement supérieur à la variabilité obtenue avec la solution la plus stable et était inférieur à toutes les autres variabilités.

En conséquence, nous avons considéré que le CRYO3 pouvait remplacer, d'un point de vue thermodynamique, les SVF et la BSA dans des solutions de cryoconservation pour embryons de lapins ou embryons de bovins produits *in vitro*.

## 2. Approche biologique

Durant l'ensemble de l'expérimentation, le CRYO3 a permis l'obtention de résultats biologiques équivalents ou supérieurs aux produits d'origine animale.

Durant l'approche *in vitro* réalisée sur les embryons de lapins, très peu d'embryons congelés ont présenté des lésions morphologiques suite à la décongélation. De plus, un nombre identique d'embryons présentaient des altérations morphologiques dans les groupes CRYO3 et SVF. Les taux de survie embryonnaires obtenus avec le groupe SVF et le groupe CRYO3 étaient similaires ou supérieurs à ceux obtenus dans d'autres études [Vicente et Garcia-Ximenez, 1994; Lopez-Bejar et Lopez-Gatius, 2002; Naik et al., 2005; Salvetti et al., 2007; Viudes De Castro et al., 2010]. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les taux de survie des deux groupes.

Lors de l'approche *in vitro* réalisée sur les embryons bovins produits *in vitro*, les taux de survie embryonnaires et les taux d'éclosions n'étaient pas différents entre le groupe SVF et le groupe BSA. Ces taux étaient légèrement inférieurs à ceux obtenus dans d'autres études portant sur la congélation de blastocystes expansés bovins produits *in vitro* et congelés dans des solutions contenant 1,5M d'EG avec ou sans 0,1M de saccharose [George et al., 2006; Assumpção et al., 2008; Kuzmany et al., 2011]. Néanmoins, il est relativement difficile de comparer les taux de survie et d'éclosions entre différentes études. De nombreux facteurs comme les conditions et milieux de culture peuvent en effet avoir un impact important sur la capacité des embryons à résister à la congélation [Gomez et al., 2008]. Nous avons donc considéré que l'équivalence des propriétés biologiques entre les groupes SVF et BSA validait leur utilisation comme solution de référence.

Les taux de survie à 48 h et d'éclosions à 72 h obtenus dans le groupe CRYO3 étaient significativement supérieurs à ceux obtenus dans les groupes SVF et BSA. De plus, ces taux étaient similaires à ceux rapportés dans les études précédemment citées [George et al., 2006; Assumpção et al., 2008; Kuzmany et al., 2011]. Les embryons du groupe CRYO3 ont également eu tendance à éclore plus rapidement que ceux de groupe BSA et ont éclos plus rapidement que ceux du groupe SVF.

Les résultats obtenus lors de la première expérimentation *in vivo* sur des embryons de lapins n'étaient pas du tout en accord avec les résultats *in vitro* présentés ci-dessus et avec les résultats obtenus lors de la deuxième expérimentation *in vivo*. L'obtention de résultats médiocres dans le groupe CRYO3 mais également dans le groupe SVF semble montrer que l'utilisation du substituant n'était pas en cause. Ceci a été en partie confirmé par les bons résultats obtenus avec du CRYO3 associé au DMSO lors de la deuxième expérimentation. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces mauvais résultats serait un défaut dans l'induction de l'ovulation des receveuses. Une nouvelle expérimentation est actuellement en cours de réalisation afin de tester de nouveau l'efficacité de solutions contenant 18% de CRYO3 lors de transfert embryonnaire sur le lapin. Nous pouvons néanmoins remarquer que peu d'embryons présentaient des altérations morphologiques après décongélation dans les groupes CRYO3 et SVF.

Les résultats obtenus lors de la seconde expérimentation ont quant à eux été relativement bons. De la même manière que précédemment, peu d'embryons présentaient des altérations morphologiques après décongélation. De plus, le taux de mise bas, le taux total de naissance et le taux de naissance de lapereaux vivants obtenus avec les groupe BSA et le groupe CRYO3/100 étaient ainsi similaires à ceux obtenus dans d'autres études [Naik et al., 2005; Lavara et al., 2011]. De plus, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes.

On pourrait cependant remarquer que de meilleurs résultats ont été obtenus dans certaines études [Lopez-Bejar et Lopez-Gatius, 2002; Salvetti et al., 2007]. Mais l'ensemble du protocole utilisé par Salvetti (solution de congélation, expérimentateur, méthodes de congélation et de transfert… etc.) a été identique à celui utilisé pour le groupe BSA. Des facteurs extérieurs jouent donc un rôle dans l'obtention des résultats après transfert embryonnaire. En conséquence, l'équivalence des résultats entre le groupe BSA et le groupe CRYO3/100 nous semble être un gage de l'efficacité de l'utilisation du CRYO3 dans des solutions de congélation pour embryons de lapins.

A partir de l'ensemble de ces résultats, nous avons considéré que le CRYO3 peut remplacer les produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de lapins et améliore même la cryoconservation des embryons bovins produits *in vitro*.

La composition du CRYO3 a fait l'objet du dépôt d'un brevet par la société STEM ALPHA (n° 03 08206). Sa composition exacte ainsi que certains composés ne sont donc pas connus. Néanmoins, une partie des propriétés biologiques du CRYO3 peut être expliquée par la présence d'un polymère synthétique de haut poids moléculaire qui joue probablement le même rôle que la BSA dans les solutions de cryoconservation. De plus, une explication de l'amélioration par le CRYO3 de la cryoconservation des embryons bovins produits *in vitro* peut être proposée. Dans les produits d'origine animale, des composés non définis, en particulier des peptides, peuvent être liés à l'albumine [Ménézo et Khatchadourian, 1986]. Ces composés peuvent avoir des effets délétères sur la survie des embryons après congélation. L'origine synthétique du CRYO3 rend la présence de composés non définis quasi impossible. Comme indiqué précédemment, les embryons produits *in vitro* sont relativement vulnérables à la congélation. Cette fragilité pourrait renforcer l'action de composants indéfinis liés à l'albumine, ce qui pourrait expliquer l'amélioration de la cryoconservation des embryons bovins produits *in vitro* engendrée par le CRYO3.

## IV. Conclusions

Les SVF sont des mélanges complexes dont la composition est variable. Les caractéristiques moyennes de solutions contenant 18% de différents SVF étaient certes similaires mais la variabilité des résultats obtenus était différente, voire très importante. Des tests physiques complémentaires pourraient permettre de mieux comprendre l'origine des variations observées.

L'impact biologique de la variabilité des résultats n'est pas encore établi. Néanmoins, son existence associée aux risques sanitaires engendrés par l'utilisation de SVF montre que ces derniers devraient être éliminés des solutions de cryoconservation ou au moins être évalués soigneusement avant leur utilisation. De même, bien que les risques sanitaires soient restreints par l'utilisation de BSA, l'absence de prions dans des produits d'origine animale ne peut être garantie. Leur utilisation dans les solutions de cryoconservation devrait donc être proscrite.

Dans nos conditions expérimentales, le CRYO3 semble être un substituant efficace aux produits d'origine animale. Ce substituant permet en effet l'obtention de résultats similaires lors de la congélation d'embryons de lapins et permet même d'améliorer la cryoconservation d'embryons bovins produits *in vitro*. En plus d'être un bon substituant, le CRYO3 présente d'autres avantages. D'une part, son origine totalement synthétique contribue à diminuer le risque sanitaire présent lors de transfert embryonnaire. Cette origine pourrait d'autre part permettre d'effectuer des changements contrôlés de sa composition afin de l'adapter à chaque type cellulaire de manière à améliorer les résultats de congélation obtenus.

Enfin, il est nécessaire de remarquer qu'aucune valeur aberrante n'a été mesurée avec le CRYO3 dans les différentes études thermodynamiques contrairement aux observations réalisées avec les SVF.

Nous en concluons que le CRYO3 peut être utilisé comme substituant aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de lapins et embryons de bovins produits *in vitro*.

# Evaluation de l'évolution des propriétés thermodynamiques de solutions de cryoconservation conservées à -20°C : influence de la présence d'antibiotiques

Lors de la conservation de solutions de cryoconservation à -20°C, une évolution de leur propriétés thermodynamiques est possible [Baudot, 1997]. Cette évolution a été attribuée à plusieurs facteurs parmi lesquels une mauvaise étanchéité du contenant engendrant une déshydratation progressive des solutions, ou encore la nature de ce contenant (verre ou polystyrène).

Lors de l'étude sur le CRYO3, les conditions de conservation ont été élaborées afin de minimiser le plus possible cette évolution. Les solutions de cryoconservation étaient ainsi stockées dans des flacons en verre dont l'influence sur l'évolution des propriétés physiques semble plus faible que d'autres contenants. Ces flacons étaient fermés par des bouchons en téflon et scellés à l'aide de parafilm afin de garantir une bonne étanchéité. Leur conservation à -20°C et à l'abri de la lumière permettait enfin d'éviter l'action des UV qui favorisent la transformation des diols en aldéhydes. Nous avons souhaité évaluer l'efficacité de ce mode de conservation et son influence sur l'évolution dans le temps des grandeurs thermodynamiques permettant de caractériser des solutions de congélation lente.

Par ailleurs, les antibiotiques utilisés dans les milieux de congélation étant connus pour avoir une influence sur les propriétés physiques de ces milieux [Salvetti et al., 2006], nous avons également décidé d'évaluer l'impact d'une association d'antibiotiques sur l'évolution de ces propriétés lors d'une conservation à -20°C.

## I. Matériel et méthodes

Les deux solutions utilisées dans cette étude ont été choisies de manière à minimiser l'impact de facteurs autres que la conservation. Pour ce faire, la composition des solutions de cryoconservation testées a été volontairement simplifiée en enlevant les composés macromoléculaires. Notre choix s'est porté sur les solutions de cryoconservation pour embryons bovins testées lors de l'étude sur le CRYO3. Les deux solutions évaluées étaient donc composées de D-PBS supplémenté de 1,5M d'EG et 0,1M saccharose (solution sans antibiotique) auxquels s'ajoutaient 100 $UI.ml^{-1}$ de pénicilline G (P3032-10MU, Sigma, France) et de 0,1 $mg.ml^{-1}$ de streptomycine (S9137-25G, Sigma, France) (solution avec antibiotiques). Pénicilline G et streptomycine ont été choisies dans la mesure où elles étaient également utilisées lors de l'étude de Salvetti [Salvetti et al., 2006].

Afin de favoriser une bonne homogénéité, les deux solutions ont été préparées simultanément. La solution sans antibiotique a tout d'abord été préparée. Une partie de cette solution a été prélevée afin d'ajouter pénicilline G et streptomycine et finaliser ainsi la composition de la solution contenant des antibiotiques. Après leur fabrication, les solutions ont été réparties dans plusieurs flacons en verre fermés par un bouchon en téflon et scellés à l'aide de parafilm. Elles ont ensuite été stockées à -20°C à l'abri de la lumière. Les précautions de préparation utilisées lors de l'étude sur le CRYO3 (préparation sous hotte à flux laminaire, filtration de la solution avant stockage… etc.) ont également été prises dans cette expérimentation.

Tous les deux mois, deux mesures ont été réalisées pour chaque solution. Le protocole utilisé pour l'évaluation thermodynamique a été identique à celui employé lors de l'étude sur le CRYO3. Brièvement, l'utilisation d'une micropipette a permis l'obtention d'échantillons de masse moyenne : 5,49 mg ± 0,50 (n = 16). Seules $T_m$ et $\Delta H$ ont été mesurées lors de la

caractérisation des deux solutions. Deux tests ont été effectués par jour, chacun impliquant une des solutions testées.

## II. Résultats

### *A. Température de fin de fusion à l'équilibre*

L'évolution des valeurs moyennes de $T_m$ était très similaire entre les solutions avec et sans antibiotiques (Figure 24). Ces valeurs avaient tendance à diminuer progressivement au cours du temps. Les droites issues de la régression linéaire des valeurs moyennes obtenues avec les deux types de solutions étaient très proches et leurs pentes étaient similaires.

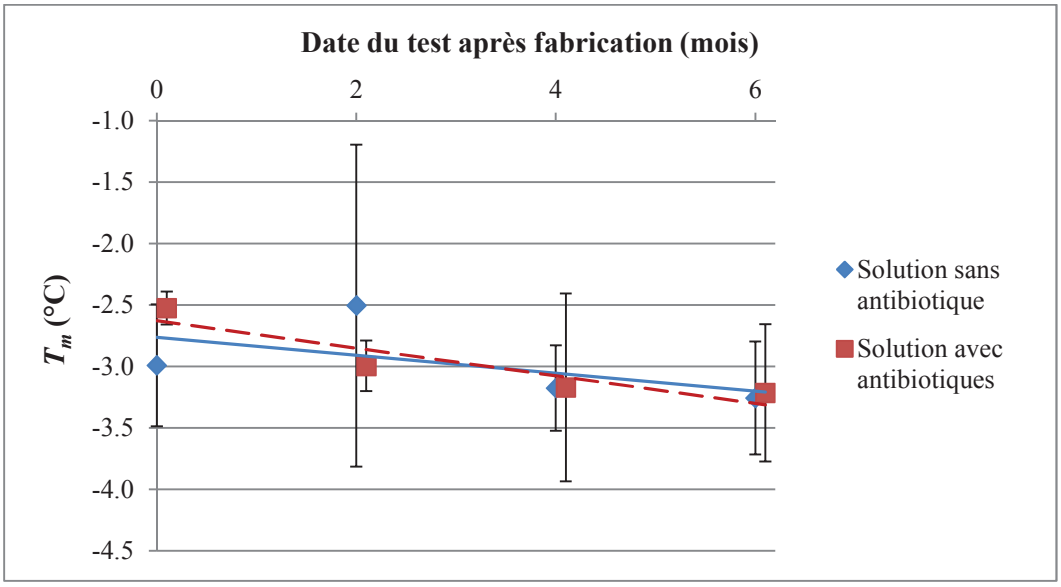



**Figure 24 : Evolution des valeurs moyennes de $T_m$ au cours du temps**

——— : Droite de régression linéaire issue des valeurs moyennes obtenues avec la solution sans antibiotique

– – – : Droite de régression linéaire issue des valeurs moyennes obtenues avec la solution contenant des antibiotiques

### *B. Variation d'enthalpie de cristallisation*

Une valeur aberrante (236,74 $J.g^{-1}$) a été mesurée lors d'un test sur la solution sans antibiotique. Cette valeur n'a pas été prise en compte pour la suite de l'analyse.

L'évolution des valeurs moyennes de $\Delta H$ était moins similaire entre les solutions avec et sans antibiotiques (Figure 25). En ce qui concerne la solution avec antibiotiques, les valeurs moyennes avaient tendance à augmenter progressivement au cours du temps. La même tendance a été observée pour les trois dernières valeurs moyennes obtenues avec la solution sans antibiotique mais elle n'a pas été confirmée par la première valeur moyenne obtenue.

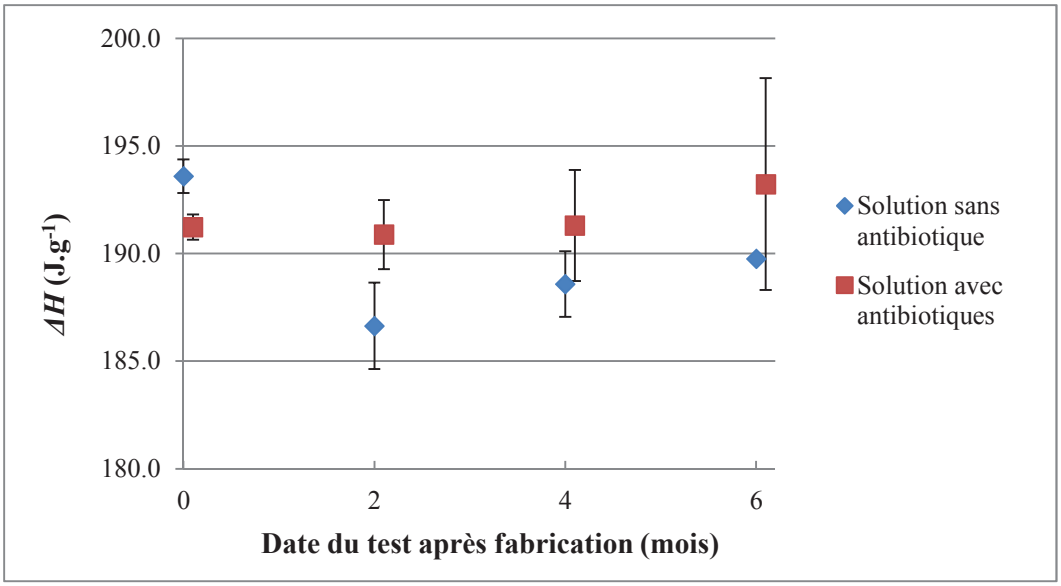



**Figure 25 : Evolution des valeurs moyennes de Δ*H* au cours du temps**

## III. Discussion et conclusions

Lors de cette étude, les valeurs moyennes de $T_m$ obtenues avec les deux solutions ont eu tendance à diminuer au cours du temps. Cette observation semble montrer une légère concentration de la solution par déshydratation, ce qui est en accord avec des observations précédentes [Baudot, 1997]. L'utilisation de flacons en verre avec des bouchons en téflon et scellés à l'aide de parafilm ne semble donc pas permettre d'éviter une perte d'eau.

Cependant, les valeurs de $\Delta H$ ont eu, à l'inverse, une légère tendance à augmenter au cours du temps. Il n'est donc pas possible actuellement de proposer une explication satisfaisante aux évolutions contradictoires de $T_m$ et $\Delta H$. Il convient d'attendre les résultats que donneront les différentes mesures réalisées au cours des prochains mois avant de proposer des hypothèses plausibles.

En ce qui concerne l'influence des antibiotiques, les résultats obtenus semblent toutefois montrer qu'ils ne jouent aucun rôle dans l'évolution des caractéristiques physiques des solutions conservées à -20°C lorsqu'ils sont en présence des composés utilisés dans cette série de mesure.

Ainsi, bien que des évolutions contradictoires aient été obtenues pour $T_m$ et $\Delta H$, la diminution des valeurs moyennes de $T_m$ au cours du temps semble indiquer une déshydratation progressive des solutions conservées à -20°C. La mise au point de contenants parfaitement étanches pourrait permettre de s'affranchir des conséquences liées à cette déshydratation, en particulier lorsque les études nécessitent une conservation longue des échantillons. En l'absence de contenants étanches, cette étude montre la nécessité de réaliser les analyses des solutions conservées dans un laps de temps relativement court (quelques semaines).

# Conclusion générale et perspectives

Dans cette étude, l'utilisation de deux approches lors de la caractérisation de solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères s'est révélée très intéressante. L'approche thermodynamique par DSC a permis de standardiser les critères de comparaison entre différentes solutions. L'approche biologique a ensuite permis de vérifier que les similitudes observées entre les caractéristiques thermodynamiques des solutions étaient accompagnées de similitudes dans leurs caractéristiques biologiques. L'efficacité du CRYO3 comme substituant aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de lapins et embryons de bovins produits *in vitro* a ainsi été mise en évidence.

De nombreuses perspectives s'ouvrent maintenant, tant sur l'utilisation de la DSC dans la compréhension et l'optimisation des protocoles de cryoconservation, que sur l'utilisation du CRYO3 dans les solutions de congélation.

Actuellement, les applications de la DSC dans le domaine de la cryobiologie sont nombreuses (caractérisation des solutions de cryoconservation, étude de la cristallisation de la glace… etc.). Néanmoins, son utilisation pourrait encore être élargie, en particulier sur l'étude des protocoles de congélation lente. Peu d'études ont en effet porté sur la caractérisation des solutions de congélation lente par DSC contrairement aux solutions de vitrification alors que cette méthode permet en particulier, pour une solution donnée, de calculer les vitesses critiques de refroidissement et de réchauffement au-delà desquelles aucun cristal de glace ne se forme. La DSC pourrait ainsi permettre une meilleure compréhension des protocoles de congélation lente et donc une amélioration de leur utilisation.

Lors de notre étude, deux grandeurs thermodynamiques ont été utilisées afin de caractériser les solutions de congélation : $T_m$ et $\Delta H$.

- Comme dit précédemment, $T_m$ est la température en dessous de laquelle la cristallisation peut avoir lieu. Afin d'éviter les problèmes de formation de glace incontrôlée, il est conseillé d'induire la cristallisation extracellulaire juste en dessous de la température de fusion [Karlsson et Toner, 1996]. $T_m$ pourrait donc être utilisée afin d'adapter la température de « seeding » aux solutions utilisées ;
- $\Delta H$, quant à elle, permet d'évaluer la quantité de glace formée dans une solution. Il serait donc possible d'adapter les cinétiques de congélation afin de minimiser la quantité de glace présente dans une solution de cryoconservation. Ceci ne sera néanmoins réellement possible que si un « seeding » peut être reproduit dans le DSC de manière à évaluer la quantité de glace dans des conditions se rapprochant de la réalité. Or il a été montré qu'un « seeding » peut être induit de manière assez reproductible en utilisant des protéines inductrices présentes chez *Pseudomonas syringae* [Kleinhans et al., 2006]. $T_m$ et $\Delta H$ pourraient donc être utilisées afin d'adapter les protocoles de cryoconservation aux solutions et cellules biologiques considérées [Neto et al., 2012].

Par ailleurs, l'analyse des résultats thermodynamiques obtenus avec les solutions utilisées comme référence a permis de définir une gamme de valeurs permettant l'obtention de résultats biologiques intéressants. Cette gamme étant commune aux solutions de cryoconservation pour embryons de bovins et de lapins, elle pourrait être utilisée comme référence dans des études ultérieures portant sur la caractérisation d'autres solutions classiquement utilisées pour la congélation d'embryons de mammifères ou encore sur l'évaluation de composés testés dans des solutions de cryoconservation. En particulier, les produits d'origine animale ne sont pas la seule source de préoccupations. Certains cryoprotecteurs pénétrants comme le DMSO sont connus pour leur rôle potentiellement

mutagène [Kapp et Eventoff, 1980]. De même, le phénomène de congélation est à l'origine d'un stress oxydant via la libération de radicaux oxygénés [Bilodeau et al., 2000; Lane et al., 2002]. Des substituants aux cryoprotecteurs pénétrants et des antioxydants représentent donc des molécules d'intérêts pour de futures études. Ces études pourraient être rapprochées des conditions réelles de congélation en évaluant par DSC des solutions contenant un ou plusieurs embryons, ce qui permettrait de prendre également en compte les effets thermodynamiques liés à leur présence.

Un deuxième champ de perspectives est ouvert par un élargissement de l'utilisation du CRYO3 en cryobiologie.

Lors de notre étude, le CRYO3 a été testé sur des embryons de lapins et de bovins produits *in vitro*. Il pourrait tout d'abord être évalué dans d'autres solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères. En particulier, les embryons bovins produits *in vitro* sont actuellement utilisés comme des modèles valables pour les techniques de reproduction assistée en médecine humaine [Ménézo et Hérubel, 2002; Adjaye et al., 2007]. Une utilisation du CRYO3 pour la congélation d'embryons humains semble donc tout à fait envisageable. Cette possibilité est d'autant plus intéressante que le CRYO3 a également déjà été utilisé avec succès pour la cryoconservation de cellules souches issues du sang de cordon ombilical humain [Jurga et al., 2012]. L'utilisation du CRYO3 pourrait ensuite être étendue à des protocoles de congélation impliquant d'autres types cellulaires.

Par ailleurs, lors de notre expérimentation, le CRYO3 a été utilisé à trois concentrations différentes : 18%, 20% et pur avec addition de 10% de DMSO. Les résultats *in vivo* obtenus avec cette dernière composition de solution ont été très encourageants. Il serait donc intéressant de tester cette solution de cryoconservation de manière plus approfondie afin d'évaluer son efficacité. En particulier, une évaluation par DSC permettrait d'affiner les valeurs de références pour lesquelles de bonnes propriétés biologiques sont conservées. Dans le même ordre d'idée, les solutions basées sur l'ajout de cryoprotecteurs à du CRYO3 pur sont relativement simples à élaborer. Il serait donc également intéressant de les tester sur d'autres types d'embryons ou types cellulaires, ce qui permettrait d'obtenir un milieu totalement défini et simple de fabrication.

Enfin, la composition chimiquement définie du CRYO3 et sa fabrication standardisée sont des atouts très importants pour la mise en place d'une recherche plus fondamentale. Les variations minimes, voire l'absence de variations entre lots, pourraient en effet permettre de mieux standardiser l'évaluation thermodynamique et biologique de protocoles de cryoconservation. L'impact de modifications de ces protocoles pourrait donc être évalué de manière plus efficace que lors de l'utilisation de solutions contenant des produits d'origine animale. Il serait en particulier possible d'évaluer l'influence nette de différents composés ajoutés aux solutions de cryoconservation sur la survie des embryons. Une solution de cryoconservation chimiquement définie a ainsi déjà permis de tester l'impact de l'ajout d'un antioxydant (le β-mercaptoéthanol) et d'acide hyaluronique dans une solution de congélation lente sur la survie d'embryons de bovins produits *in vitro* [George et al., 2006]. L'évaluation de modifications des cinétiques de refroidissement et de réchauffement pourrait également être envisagée.

Pour conclure, les résultats prometteurs obtenus grâce à l'association d'une méthode physique et d'une méthode biologique pourraient ouvrir la voie à l'utilisation d'autres associations entre ces deux types de méthodes. La DSC ne permet en effet pas d'étudier tous les phénomènes et propriétés physiques utiles à la compréhension des mécanismes de cryoconservation. Il ne semble par exemple pas possible de caractériser la perméabilité membranaire des embryons aux cryoprotecteurs ou encore la structure des cristaux de glace.

L’utilisation d’autres méthodes d’analyse physique, telles que des méthodes d’imagerie associées à des marquages de molécules, pourrait permettre de mieux comprendre les protocoles de cryoconservation et ainsi de mieux les adapter aux différents types cellulaires. Des méthodes biologiques resteraient ensuite indispensables afin de valider les observations et conclusions physiques obtenues.

# *Bibliographie*

1. Abdalla H, Shimoda M, Hara H, Morita H, Kuwayama M, et al. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. Theriogenology 2010;74:1028-1035.

2. Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. Mol Reprod Dev 2002;61:57-66.

3. Adjaye J, Herwig R, Brink TC, Herrmann D, Greber B, et al. Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. Physiol Genomics 2007;31:315-327.

4. Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA, Schaefer DM, et al. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. Theriogenology 1998;50:147-162.

5. Alapati R, Goff K, Kubisch HM, Devireddy RV. Water transport in epididymal and ejaculated rhesus monkey (Macaca mulatta) sperm during freezing. Cryobiology 2008;57:182-185.

6. Alapati R, Stout M, Saenz J, Gentry GT, Jr., Godke RA, et al. Comparison of the permeability properties and post-thaw motility of ejaculated and epididymal bovine spermatozoa. Cryobiology 2009;59:164-170.

7. Anthony P, Jelodar K, Lowe KC, Power JB, Davey MR. Pluronic F-68 increases the post-thaw growth of cryopreserved plant cells. Cryobiology 1996;33:508-514.

8. Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, Appleton TC, Ashorn R. Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. Hum Reprod 1988;3:795-802.

9. Assumpção MEOA, Milazzotto MP, Simoes R, Nicacio AC, Mendes CM, et al. *In vitro* survival of *in vitro*-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. Animal Reproduction 2008;5:116-120.

10. Barcelo-Fimbres M, Seidel GE, Jr. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. Mol Reprod Dev 2007;74:1395-1405.

11. Baudot A (1997) Cryopreservation d'organes par vitrification Mesures calorimétriques et mesures diélectriques. Grenoble: Institut National Polytechnique Grenoble. 240 p.

12. Baudot A, Boutron P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. Cryobiology 1998;37:187-199.

13. Baudot A, Alger L, Boutron P. Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. Cryobiology 2000;40:151-158.

14. Baudot A, Cacela C, Duarte ML, Fausto R. Thermal study of simple amino-alcohol solutions. Cryobiology 2002;44:150-160.

15. Baudot A, Odagescu V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. Cryobiology 2004;48:283-294.

16. Baudot A, Courbiere B, Odagescu V, Salle B, Mazoyer C, et al. Towards whole sheep ovary cryopreservation. Cryobiology 2007;55:236-248.

17. Benson JD, Bagchi A, Han X, Critser JK, Woods EJ. Melting point equations for the ternary system water/sodium chloride/ethylene glycol revisited. Cryobiology 2010;61:352-356.

18. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. Cryobiology 2000;40:110-116.

19. Bielanski A, Bergeron H, Lau PC, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. Cryobiology 2003;46:146-152.

20. Bielanski A, Algire J, Lalonde A, Nadin-Davis S. Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via *in vitro*-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. Theriogenology 2009;71:499-508.

21. Bielanski A, Lalonde A. Effect of cryopreservation by slow cooling and vitrification on viral contamination of IVF embryos experimentally exposed to bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1. Theriogenology 2009;72:919-925.

22. Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. Theriogenology 2012;77:467-482.

23. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev 2000;55:282-288.

24. Block J, Bonilla L, Hansen PJ. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. Theriogenology 2009;71:1063-1071.

25. Bolin SR, Ridpath JF. Prevalence of bovine viral diarrhea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. J Vet Diagn Invest 1998;10:135-139.

26. Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. Intercellular communication in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. Biol Reprod 1999;61:1050-1055.

27. Boutron P. More accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions: comparison with equilibrium. Cryobiology 1984;21:183-191.

28. Boutron P. Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. Cryobiology 1986;23:88-102.

29. Boutron P, Mehl P. Theoretical prediction of devitrification tendency: determination of critical warming rates without using finite expansions. Cryobiology 1990;27:359-377.

30. Bruckner L. The TSE risk versus the BVDV risk. International workshop on pestivirus contamination of bovine sera and other bovine virus contamination organised by the EDQM 29-30 mars 2001. Paris, France.

31. Campos-Chillon LF, Walker DJ, de la Torre-Sanchez JF, Seidel GE, Jr. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. Theriogenology 2006;65:1200-1214.

32. Chiu MH, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. J Pharm Bioallied Sci 2011;3:39-59.

33. Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS, Kong IK. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). Anim Reprod Sci 2002;73:151-158.

34. Cho SR, Cho SK, Lee SL, Lee HJ, Choe SY, et al. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced *in vitro* in serum-free medium. J Assist Reprod Genet 2002;19:487-492.

35. Clas SD, Dalton CR, Hancock BC. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. Pharm Sci Technol To 1999;2:311-320.

36. Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. Biol Reprod 2000;62:1459-1465.

37. Crowe JH, Crowe LM, Tablin F, Wolkers W, Oliver AE, et al. In: Fuller BJ, lane N, Benson EE, editors. Stabilization of cells during Freeze-Drying: The Trehalose Myth, Boca Raton: CRC Press; 2004, p. 205-236.

38. Cuello C, Berthelot F, Delaleu B, Venturi E, Pastor LM, et al. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified-warmed porcine blastocysts: an ultrastructural and cell death study. Theriogenology 2007;67:970-982.

39. DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). Food Chem Toxicol 2003;41:319-326.

40. Devireddy RV, Raha D, Bischof JC. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. Cryobiology 1998;36:124-155.

41. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Bischof JC. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. Biol Reprod 1999;61:764-775.

42. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Pryor JL, Bischof JC. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. Hum Reprod 2000;15:1125-1135.

43. Devireddy RV, Swanlund DJ, Olin T, Vincente W, Troedsson MH, et al. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. Biol Reprod 2002;66:222-231.

44. Devireddy RV, Fahrig B, Godke RA, Leibo SP. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. Mol Reprod Dev 2004;67:446-457.

45. Devireddy RV, Campbell WT, Buchanan JT, Tiersch TR. Freezing response of white bass (Morone chrysops) sperm cells. Cryobiology 2006;52:440-445.

46. Devireddy RV, Li G, Leibo SP. Suprazero cooling conditions significantly influence subzero permeability parameters of mammalian ovarian tissue. Mol Reprod Dev 2006;73:330-341.

47. Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, et al. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. Theriogenology 2001;55:923-936.

48. Dobrinsky JR, Overström EW, Duby RT, Johnson LA, Duffy P, et al. Effect of cytoskeletal stabilization on the development of bovine embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology 1995;43:199 (Abstract).

49. Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology 1996;45:17-26.

50. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol Reprod 2000;62:564-570.

51. Dochi O, Takahashi K, Hirai T, Hayakawa H, Tanisawa M, et al. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. Theriogenology 2008;69:124-128.

52. Drew TW, Sandvik T, Wakeley P, Jones T, Howard P. BVD virus genotype 2 detected in British cattle. Vet Rec 2002;151:551.

53. Dumoulin JC, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Enginsu ME, Geraedts JP, et al. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. Fertil Steril 1994;62:793-798.

54. Dussurgel O, Henry A, Lemercier B, Roulland-Dussoix D. Polymerase chain reaction-based diagnosis of mollicture infection of commercial animal sera. J Microbiol Meth 1994;20:125-135.

55. Elschner T, Wondraczek H, Heinze T. Syntheses and detailed structure characterization of dextran carbonates. Carbohyd polym 2012:ahead to print.

56. Erickson GA, Bolin SR, Landgraf JG. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. Dev Biol Stand 1991;75:173-175.

57. Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. Trends Biotechnol 2006;24:105-108.

58. Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. Mol Reprod Dev 2001;58:186-195.

59. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. Cryo Letters 2004;25:375-388.

60. Furnus CC, de Matos DG, Martinez AG. Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology 1998;49:1489-1499.

61. Gajda B, Smorag Z. Oocyte and embryo cryopreservation - state of art and recent developments in domestic animals. J Anim Feed Sci 2009;18:371-387.

62. Gall Y. Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation. Ann Dermatol Venereol 2010;137 Suppl 1:S30-39.

63. Gao D, Zhou X. In: Katkov I, editors. Prevention of Lethal Osmotic Injury to Cells during Addition and Removal of Cryoprotective Agents: Theory and Technology, Rijeka (Croatia): Intech; 2012, p. 205-236.

64. George F, Vrancken M, Verhaeghe B, Verhoeye F, Schneider YJ, et al. Freezing of *in vitro*-produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones. Theriogenology 2006;66:1381-1390.

65. George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, et al. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. Theriogenology 2008;69:612-623.

66. Givens MD, Riddell KP, Galik PK, Stringfellow DA, Brock KV, et al. Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhea virus in IVF embryo production. Theriogenology 2002;58:1399-1407.

67. Givens MD, Marley SD. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. Theriogenology 2008;69:129-136.

68. Gomez E, Rodriguez A, Munoz M, Caamano JN, Hidalgo CO, et al. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. Theriogenology 2008;69:1013-1021.

69. Gomez E, Munoz M, Rodriguez A, Caamano JN, Facal N, et al. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro* inflicts selective damage to the inner cell mass. Reprod Domest Anim 2009;44:194-199.

70. Gordon-Kamm WJ, Steponkus PL. Lamellar-to-hexagonal$_{II}$ phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration. Proc Natl Acad Sci U S A 1984a;81:6373-6377.

71. Gordon-Kamm WJ, Steponkus PL. The Behavior of the Plasma Membrane Following Osmotic Contraction of Isolated Protoplasts: Implications in Freezing Injury. Protoplasma 1984b;123:83-94.

72. Gosden RG, Yin H, Bodine RJ, Morris GJ. Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy. Hum Reprod 2010;25:470-478.

73. Guérin B, Nibart M, Marquant - Le Guienne B, Humblot P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. Theriogenology 1997;47:33-42.

74. Gutierrez A, Garde J, Artiga CG, Munoz I, Pintado B. *In vitro* survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. Theriogenology 1993;39:1111-1120.

75. Guyader-Joly C, Ponchon S, Durand M, Heyman Y, Renard JP, et al. Effect of lecithin on *in vitro* and *in vivo* survival of *in vitro*-produced bovine blastocysts after cryopreservation. Theriogenology 1999;52:1193-1202.

76. Guyader-Joly C, Knijn H, Ponchon S, Gonzalez C, Ponsart C. Embryo development and pregnancy rate after direct transfer of cryopreserved *in vitro*-cultured bovine embryos in SOF medium. 27th congress of the European Embryo Transfer Association, 09-10 septembre 2011. Chester, Angleterre.

77. Han X, Liu Y, Critser JK. Determination of the quaternary phase diagram of the water-ethylene glycol-sucrose-NaCl system and a comparison between two theoretical methods for synthetic phase diagrams. Cryobiology 2010;61:52-57.

78. Hansen PJ, Block J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. Reprod Fertil Dev 2004;16:1-14.

79. Hansen PJ. Realizing the promise of IVF in cattle - an overview. Theriogenology 2006;65:119-125.

80. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 1995;43:141-152.

81. Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. Theriogenology 1997;48:563-579.

82. Hasler JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. Reproduction Fertility and Development 2010;22:119-125.

83. He X, Park EY, Fowler A, Yarmush ML, Toner M. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells. Cryobiology 2008;56:223-232.

84. Hengherr S, Worland MR, Reuner A, Brummer F, Schill RO. Freeze tolerance, supercooling points and ice formation: comparative studies on the subzero temperature survival of limno-terrestrial tardigrades. J Exp Biol 2009;212:802-807.

85. Hengherr S, Reuner A, Brummer F, Schill RO. Ice crystallization and freeze tolerance in embryonic stages of the tardigrade *Milnesium tardigradum*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2010;156:151-155.

86. Hochi S, Semple E, Leibo SP. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos. Theriogenology 1996;46:837-847.

87. Hochi S, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*-produced bovine morulae. Theriogenology 1999;52:497-504.

88. Honn KV, Singley JA, Chavin W. Fetal bovine serum: a multivariate standard. Proc Soc Exp Biol Med 1975;149:344-347.

89. Horvath G, Seidel GE, Jr. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. Theriogenology 2006;66:1026-1033.

90. Hotamisligil S, Toner M, Powers RD. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. Biol Reprod 1996;55:161-168.

91. Houe H. Economic impact of BVDV infection in dairies. Biologicals 2003;31:137-143.

92. Houston F, McCutcheon S, Goldmann W, Chong A, Foster J, et al. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. Blood 2008;112:4739-4745.

93. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 2003;46:205-229.

94. Hubel A, Cravalho EG, Nunner B, Korber C. Survival of directionally solidified B-lymphoblasts under various crystal growth conditions. Cryobiology 1992;29:183-198.

95. Ishiguro H, Rubinsky B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. Cryobiology 1994;31:483-500.

96. Issartel J, Voituron Y, Odagescu V, Baudot A, Guillot G, et al. Freezing or supercooling: how does an aquatic subterranean crustacean survive exposures at subzero temperatures? J Exp Biol 2006;209:3469-3475.

97. Iwasaki S, Yoshiba N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. J Reprod Fertil 1990;90:279-284.

98. Jiang Z, Imrie CT, Hutchinson JM. An introduction to temperature modulated differential scanning calorimetry (TMDSC): a relatively non-mathematical approach. Thermochim Acta 2002;387:75-93.

99. Jin B, Kusanagi K, Ueda M, Seki S, Valdez DM, Jr., et al. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. Cryobiology 2008;56:233-240.

100. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Altern Lab Anim 2002;30:219-227.

101. Johnson RT. Prion diseases. Lancet Neurol 2005;4:635-642.

102. Joly T, Nibart M, Thibier M. Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the deep-freezing of embryos from mice and sheep : an *in vitro* investigation. Theriogenology 1992;37:473-480.

103. Joly T, Theau-Clément M, Drouet-Viard F, de Rochambeau H, Renard JP. Application de la cryoconservation des embryons à la protection des ressources génétiques chez le lapin. Genet Sel Evol 1994;26 (suppl. 1):267-278.

104. Joly T, de Rochambeau H, Renard JP. Établissement d'une cryobanque d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez le lapin: aspects pratiques. Genet Sel Evol 1998;30 (suppl. 1):259-269.

105. Joly T, Neto V, Salvetti P. In: Katkov I, editors. Cryopreservation of Genetic Diversity in Rabbit Species (*Oryctolagus cuniculus*), Rijeka (Croatia): Intech; 2012, p. 179-186.

106. Jurga M, Forraz N, Basford C, Atzeni G, Trevelyan AJ, et al. Neurogenic properties and a clinical relevance of multipotent stem cells derived from cord blood samples stored in the biobanks. Stem Cells Dev 2012;21:923-936.

107. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, et al. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. Biol Reprod 2001;65:1127-1134.

108. Kapp RW, Jr., Eventoff BE. Mutagenicity of dimethylsulfoxide (DMSO): *in vivo* cytogenetics study in the rat. Teratog Carcinog Mutagen 1980;1:141-145.

109. Karlsson JO, Cravalho EG, Borel Rinkes IH, Tompkins RG, Yarmush ML, et al. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. Biophys J 1993;65:2524-2536.

110. Karlsson JO, Cravalho EG, Toner M. A model of diffusion-limited ice growth inside biological cells during freezing. J Appl Phys 1994;75:4442-4455.

111. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials 1996;17:243-256.

112. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Survival of rat embryos after freezing. J Reprod Fertil 1982;66:367-370.

113. Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T, et al. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. Cryobiology 1996;33:459-464.

114. Khurana NK, Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. Biol Reprod 2000;62:847-856.

115. Kleinhans FW, Guenther JF, Roberts DM, Mazur P. Analysis of intracellular ice nucleation in Xenopus oocytes by differential scanning calorimetry. Cryobiology 2006;52:128-138.

116. Kleinhans FW, Mazur P. Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest. Cryobiology 2007;54:212-222.

117. Knepper PA, Mayanil CS, Goossens W, McLone DC, Hayes E. The presence of transcription factors in fetal bovine sera. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim 1998;34:170-173.

118. Kniazeff AJ, Wopschall LJ, Hopps HE, Morris CS. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. *In Vitro* 1975;11:400-403.

119. Krisher RL, Lane M, Bavister BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. Biol Reprod 1999;60:1345-1352.

120. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology 1999;38:119-130.

121. Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. Cryobiology 2001;43:21-31.

122. Kuzmany A, Havlicek V, Wrenzycki C, Wilkening S, Brem G, et al. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. Theriogenology 2011;75:482-494.

123. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. Nat Biotechnol 1999;17:1234-1236.

124. Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. Hum Reprod 2002;17:2686-2693.

125. Lane M, Maybach JM, Hooper K, Hasler JF, Gardner DK. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. Mol Reprod Dev 2003;64:70-78.

126. Lapa M, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, et al. Fatty Acid Profile of Oocytes and Blastocysts during *In Vitro* Bovine Embryo Production. Reprod Domest Anim 2005;40:365.

127. Lavara R, Baselga M, Vicente JS. Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? Theriogenology 2011;76:652-657.

128. Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, et al. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. Biol Reprod 2002;67:767-775.

129. Le Tallec B, Ponsart C, Guérin B. Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. 17th congress of the European Embryo Transfer Association, 07-08 septembre 2001. Lyon, France.

130. Leibo SP, Lostukoff NM. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. Theriogenology 1993;39:81-94.

131. Leibo SP, Pool TB. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. Fertil Steril 2011;96:269-276.

132. Leoni G, Bogliolo L, Berlinguer F, Rosati I, Pintus PP, et al. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of *in vitro*-derived ovine embryos. Cryobiology 2002;45:204-212.

133. Levings RL, Wessman SJ. Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. Dev Biol Stand 1991;75:177-181.

134. Li G, Thirumala S, Leibo SP, Devireddy RV. Subzero water transport characteristics and optimal rates of freezing rhesus monkey (*Macaca mulatta*) ovarian tissue. Mol Reprod Dev 2006;73:1600-1611.

135. Li R, Wen L, Wang S, Bou S. Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. Theriogenology 2006;66:404-414.

136. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, et al. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. Biol Reprod 2002;67:1671-1680.

137. Liebermann J. In: Katkov I, editors. Vitrification of Oocytes and Embryos, Rijeka (Croatia): Intech; 2012, p. 205-236.

138. Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, et al. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. Anim Reprod Sci 2008;103:239-248.

139. Lindberg A, Ortman K, Alenius S. Seroconversion of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy heifers after embryo transfer. 14th International Congress on Animal Reproduction, 2-6 juillet 2000. Stockolm, Sweden.

140. Lindberg AL. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. Vet Q 2003;25:1-16.

141. Liu XH, Zhang T, Rawson DM. Differential scanning calorimetry studies of intraembryonic freezing and cryoprotectant penetration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. J Exp Zool 2001;290:299-310.

142. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. Lancet 2004;363:417-421.

143. Lopez-Bejar M, Lopez-Gatius F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. Theriogenology 2002;58:1541-1552.

144. mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT, De Kruif A. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. Theriogenology 1994;42:1389-1397.

145. Makarevich AV, Chrenek P, Olexikova L, Popelkova M, Turanova Z, et al. Post-thaw survival, cell death and actin cytoskeleton in gene-microinjected rabbit embryos after vitrification. Theriogenology 2008;70:675-681.

146. Markarian SA, Bonora S, Bagramyan KA, Arakelyan VB. Glass-forming property of the system diethyl sulphoxide/water and its cryoprotective action on Escherichia coli survival. Cryobiology 2004;49:1-9.

147. Martinez AG, De Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM. *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology 1997;50:757-767.

148. Martinez AG, Valcarcel A, de las Heras MA, de Matos DG, Furnus C, et al. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. Anim Reprod Sci 2002;73:11-21.

149. Martinez D, Angeles Revilla M, Espina A, Jaimez E, Garcia JR. Survival cryopreservation of hop shoot tips monitored by differential scanning calorimetry. Thermochimica acta 1998;317:91-94.

150. Martinez D, Angeles Revilla M, Espina A, Jaimez E, Garcia JR. Differential scanning calorimetry applied to the storage at ultra low temperatures of olive and hop *in vitro* grown shoot-tips. Thermochimica acta 2000;349:147-151.

151. Mazur P. In: Fuller BJ, lane N, Benson EE, editors. Principles of cryobiology, Boca Raton: CRC Press; 2004, p. 205-236.

152. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE, Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. Biol Reprod 2008;78:2-12.

153. Mazur P, Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196 degrees C at 95 degrees to 70,000 degrees C/min and warmed at 610 degrees to 118,000 degrees C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. Cryobiology 2011;62:1-7.

154. McGrath J. In: K D, editors. Cold-shock: thermoelastic stress in chilled biological membranes, New York: American Society of Mechanical Engineers; 1987, p. 57-66.

155. Mehaisen GM, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS, Lavara R. *In vitro* and *in vivo* viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. Theriogenology 2006;65:1279-1291.

156. Men H, Zhao C, Si W, Murphy CN, Spate L, et al. Birth of piglets from *in vitro*-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system. Theriogenology 2011;76:280-289.

157. Ménézo Y, Khatchadourian C. Peptides bound to albumin. Life Sciences 1986;39:1751-1753.

158. Ménézo YJ, Hérubel F. Mouse and bovine models for human IVF. Reprod Biomed Online 2002;4:170-175.

159. Ménézo YJ. Blastocyst freezing. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004;115 Suppl 1:S12-15.

160. Meryman HT. In: Meryman HT, editors. Heterogeneous nucleation, London and New York: Academic press; 1966, p. 13-14.

161. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. Transfusion 2007;47:935-945.

162. Moce ML, Blasco A, Santacreu MA. *In vivo* development of vitrified rabbit embryos: effects on prenatal survival and placental development. Theriogenology 2010;73:704-710.

163. Momozawa K, Fukuda Y. Vitrification of Bovine Blastocysts on a Membrane Filter Absorbing Extracellular Vitrification Solution. J Mamm Ova Res 2006;23:63-66.

164. Moore K, Bonilla AQ. Cryopreservation of mammalian embryos: the state of the art. Annu Rev Biomed Sci 2006;8:19-32.

165. Moreira da Silva F, Metelo R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. Reprod Domest Anim 2005;40:205-209.

166. Morris GJ, Goodrich M, Acton E, Fonseca F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. Cryobiology 2006;52:323-334.

167. Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Otoi T, Suzuki T. The effect of prefreezing the diluent portion of the straw in a step-wise vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts. Cryobiology 2001;42:135-138.

168. Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Rajamahendran R, Suzuki T. Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. Theriogenology 2003;59:1393-1402.

169. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. Theriogenology 2006;65:1551-1562.

170. Muldrew K, Acker JP, Elliott JAW, McGann LE. In: Fuller BJ, lane N, Benson EE, editors. The Water to Ice Transition: Implications for Living Cells, Boca Raton: CRC Press; 2004, p. 205-236.

171. Mullen SF, Critser JK. In: Woodruff TK, Snyder KA, editors. The Science of Cryobiology, New York: Springer; 2007, p. 83-103.

172. Naik BR, Rao BS, Vagdevi R, Gnanprakash M, Amarnath D, et al. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. Anim Reprod Sci 2005;86:329-338.

173. Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, et al. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. Anim Reprod Sci 1997;48:247-256.

174. Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, et al. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. Theriogenology 2004;62:437-449.

175. Nedambale TL, Du F, Yang X, Tian XC. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. Anim Reprod Sci 2006;93:61-75.

176. Neto V, Joly T, Commin L, Bruyère P, Baudot A, et al. In: Katkov I, editors. New Approaches of Ovarian Tissue Cryopreservation from Domestic Animal Species, Rijeka (Croatia): Intech; 2012, p. 205-236.

177. Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. Theriogenology 2000;53:21-34.

178. Nims RW, Gauvin G, Plavsic M. Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes - a review. Biologicals 2011;39:370-377.

179. Nowshari MA, Brem G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. Theriogenology 2000;53:1157-1166.

180. Odagescu V (2005) Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices. Grenoble: Université Joseph Fourier. 168 p.

181. Overström EW, Duby RT, Dobrinsky JR, Robl JM, Baguisi A, et al. Cytoskeletal damage in vitrified or frozen bovine embryos. Theriogenology 1993;39:276 (Abstract).

182. PAA. Sérums pour la culture cellulaire. 2012. Retrieved 04/13/2012, from http://www.paa.com/no_cache/download/brochures/seraproducts.html?cid=1917&did=284&sechash=2f1fad1b.

183. Palasz A, Alkemade S, Mapletoft RJ. Substitution of chemically defined macromolecules for protein in murine embryo freezing medium. Theriogenology 1990;33:195 (Abstract).

184. Palasz AT, Tornesi MB, Archer J, Mapletoft RJ. Media alternatives for the collection, culture and freezing of mouse and cattle embryos. Theriogenology 1995;44:705-714.

185. Palasz AT, Gustafsson H, Rodriguez-Martinez H, Gusta L, Larsson B, et al. Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. Theriogenology 1997;47:865-879.

186. Palasz AT, Thundathil J, De La Fuente J, Mapletoft RJ. Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. Cryobiology 2000;41:35-42.

187. Papis K, Sypecka J, Korwin-Kossakowski M, Wenta-Muchalska E, Bilska B. Banking of embryos of mutated, paralytic tremor rabbit by means of vitrification. Lab Anim 2005;39:284-289.

188. Papis K, Korwin-Kossakowski M, Wenta-Muchalska E. Efficacy of traditional and modified (Vitmaster) methods of rabbit embryos vitrification. 25th congress of the European Embryo Transfer Association, 11-12 septembre 2009. Poznan, Pologne.

189. Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Anim Reprod Sci 2007;98:293-301.

190. Pereira RM, Carvalhais I, Pimenta J, Baptista MC, Vasques MI, et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. Anim Reprod Sci 2008;106:322-332.

191. Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell Tissue Bank 2008;9:267-277.

192. Perry GH. Risk assessment of transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in abattoir-derived *in vitro*-produced embryos. Theriogenology 2007;68:38-55.

193. Pihakaski-Maunshach K, Kukkonen M. Ultrastructural changes induced by sub-zero temperatures in the plasma membrane of protoplasts from winter rye. Physiol Plantarum 1997;100:333-340.

194. Pinisetty D, Huang C, Dong Q, Tiersch TR, Devireddy RV. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, Xiphophorus maculatus. Cryobiology 2005;50:250-263.

195. Plante L, King WA. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. J Assist Reprod Genet 1994;11:515-529.

196. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949;164:666.

197. Pollard JW, Leibo SP. Comparative cryobiology of *in vitro*- and *in vivo*-derived bovine embryos. Theriogenology 1993;39:287 (Abstract).

198. Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, et al. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. Theriogenology 2005;63:2254-2268.

199. Prickett RC, Elliott JA, McGann LE. Application of the multisolute osmotic virial equation to solutions containing electrolytes. J Phys Chem B 2011;115:14531-14543.

200. Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. Anim Reprod Sci 2000;58:9-22.

201. Puschel B, Daniel N, Bitzer E, Blum M, Renard JP, et al. The rabbit (Oryctolagus cuniculus): a model for mammalian reproduction and early embryology. Cold Spring Harb Protoc 2010;2010:pdb emo139.

202. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org/. 2011.

203. Rall WF, Polge C. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. J Reprod Fertil 1984;70:285-292.

204. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. Nature 1985;313:573-575.

205. Ramlov H. Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. Hum Reprod 2000;15 Suppl 5:26-46.

206. Rauch C, Feifel E, Amann EM, Spotl HP, Schennach H, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. ALTEX 2011;28:305-316.

207. Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG, Alberio RH. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. Anim Reprod Sci 2010;118:19-24.

208. Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology 2001;56:1-16.

209. Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology 1985;22:367-377.

210. Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. Theriogenology 1996;46:331-343.

211. Salvetti P, Joly T, Baudot A. Effect of antibiotics on thermodynamic properties of freezing media in rabbit species: A first calorimetric approach. Cryobiology 2006;53:268-275.

212. Salvetti P, Joly T, Renard JP. Viability of rabbit embryos after 14 years storage in liquid nitrogen. Cryobiology 2007;55:364 (Abstract).

213. Salvetti P, Theau-Clement M, Beckers JF, Hurtaud J, Guerin P, et al. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. Theriogenology 2007;67:1185-1193.

214. Sanchez-Osorio J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Maside C, et al. Vitrification and warming of *in vivo*-derived porcine embryos in a chemically defined medium. Theriogenology 2010;73:300-308.

215. Sansinena M, Santos MV, Zaritzky N, Chirife J. Comparison of heat transfer in liquid and slush nitrogen by numerical simulation of cooling rates for French straws used for sperm cryopreservation. Theriogenology 2012;77:1717-1721.

216. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction 2011;141:1-19.

217. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. J Pharm Sci 2001;90:860-871.

218. Seidel GE, Elsden RP, Brink Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. Theriogenology 1990;33:322 (Abstract).

219. Seidel GE, Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology 2006;65:228-235.

220. Seki S, Kleinhans FW, Mazur P. Intracellular ice formation in yeast cells vs. cooling rate: predictions from modeling vs. experimental observations by differential scanning calorimetry. Cryobiology 2009;58:157-165.

221. Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. Cryobiology 2009;59:75-82.

222. Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. Cryobiology 1997;35:219-229.

223. Shehab-El-Deen MA, Leroy JL, Maes D, Van Soom A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. Reprod Domest Anim 2009;44:140-142.

224. Shirazi A, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B, Shams-Esfandabadi N. Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced *in vitro*. Cryobiology 2009;59:285-290.

225. Skyba M, Faltus M, Zamecnik J, Cellarova E. Thermal analysis of cryopreserved Hypericum perforatum L. shoot tips: Cooling regime dependent dehydration and ice growth. Thermochimica acta 2011;514:22-27.

226. Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. Cryobiology 1999;38:95-105.

227. Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Bruning K, Wrenzycki C. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. Theriogenology 2011;76:1433-1441.

228. Stringfellow DA, Givens MD, Eds. (2010). Manual of the International Embryo Transfer Society, Fourth edition. Champaign (Illinois, USA).

229. Stringfellow JS, Hathcock TL, Riddell KP, Stringfellow DA, Galik PK, et al. Introduction of *Stenotrophomonas maltophilia* through semen used for *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology 1997;47:382 (Abstract).

230. Stroud B. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee report. 2011. Retrieved 03/21/2012, from http://www.iets.org/pdf/December2011.pdf.

231. Szczerba M, Środoń J, Skiba M, Derkowski A. One-dimensional structure of exfoliated polymer-layered silicate nanocomposites: A polyvinylpyrrolidone (PVP) case study. Appl Clay Sci 2010;47:235-241.

232. Takamatsu H, Zawlodzka S. Contribution of extracellular ice formation and the solution effects to the freezing injury of PC-3 cells suspended in NaCl solutions. Cryobiology 2006;53:1-11.

233. Taylor DM. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. Vet J 2000;159:10-17.

234. Techakumphu M, Heyman Y. Survival of Frozen-Thawed Rabbit Morulae after Synchronous or Asynchronous Transfer. Anim Reprod Sci 1987;12:305-312.

235. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. Lancet 1995;346:137-140.

236. Tedeschi R, De Paoli P. Collection and preservation of frozen microorganisms. Methods Mol Biol 2011;675:313-326.

237. Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TA. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. Reproduction 2005;129:789-798.

238. Thibier M. The 1997 Embryo Transfer Statistics from Around the World. A Data Retrieval Committee Report. 1998. Retrieved 03/22/2012, from http://www.iets.org/pdf/December1998.pdf.

239. Thirumala S, Ferrer MS, Al-Jarrah A, Eilts BE, Paccamonti DL, et al. Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. Cryobiology 2003;47:109-124.

240. Thirumala S, Huang C, Dong Q, Tiersch TR, Devireddy RV. A theoretically estimated optimal cooling rate for the cryopreservation of sperm cells from a live-bearing fish, the green swordtail Xiphophorus helleri. Theriogenology 2005;63:2395-2415.

241. Thirumala S, Campbell WT, Vicknair MR, Tiersch TR, Devireddy RV. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. Theriogenology 2006;66:964-973.

242. Thompson JG. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. Reprod Fertil Dev 1997;9:341-354.

243. Titterington JL, Robinson J, Killick SR, Hay DM. Synthetic and biological macromolecules: protection of mouse embryos during cryopreservation by vitrification. Hum Reprod 1995;10:649-653.

244. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983;305:707-709.

245. Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. Biol Reprod 1999;60:534-539.

246. Vajta G, Hyttel P, Callesen H. Morphological changes of *in vitro*-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. Mol Reprod Dev 1997;48:9-17.

247. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev 1998;51:53-58.

248. Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, et al. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. Theriogenology 1999;52:939-948.

249. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim Reprod Sci 2000;60-61:357-364.

250. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. Theriogenology 2006;65:236-244.

251. van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. Toxicol *In Vitro* 2004;18:1-12.

252. Van der valk P. Results of the EMEA/CVMP/FEDESA survey. International workshop on pestivirus contamination of bovine sera and other bovine virus contamination organised by the EDQM 29-30 mars 2001. Paris (France).

253. Vicente JS, Garcia-Ximenez F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. Theriogenology 1994;42:1205-1215.

254. Vicente JS, Garcia-Ximenez F. Direct transfer of vitrified rabbit embryos. Theriogenology 1996;45:811-815.

255. Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, Garcia ML. *In vivo* survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. Reprod Nutr Dev 1999;39:657-662.

256. Vieira AD, Forell F, Feltrin C, Rodrigues JL. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. Anim Reprod Sci 2007;99:377-383.

257. Visintin JA, Martins JF, Bevilacqua EM, Mello MR, Nicacio AC, et al. Cryopreservation of Bos taurus vs Bos indicus embryos: are they really different? Theriogenology 2002;57:345-359.

258. Viudes De Castro MP, Cortell C, Vicente JS. Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. Theriogenology 2010;74:1623-1628.

259. Viuff D, Rickords L, Offenberg H, Hyttel P, Avery B, et al. A high proportion of bovine blastocysts produced *in vitro* are mixoploid. Biol Reprod 1999;60:1273-1278.

260. Walker DJ, Campos-Chillon LF, Seidel GE. Vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos by addition of ethylene glycol in one-step. Reprod Domest Anim 2006;41:467-471.

261. Wallis C, Melnick JL. Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide. J Virol 1968;2:953-954.

262. Wang GM, Haymet ADJ. Trehalose and Other Sugar Solutions at Low Temperature: Modulated Differential Scanning Calorimetry (mDSC). J Phys Chem B 1998;102:5341-5347.

263. Wang HY, Lu SS, Lun ZR. Glass transition behavior of the vitrification solutions containing propanediol, dimethyl sulfoxide and polyvinyl alcohol. Cryobiology 2009a;58:115-117.

264. Wang HY, Inada T, Funakoshi K, Lu SS. Inhibition of nucleation and growth of ice by poly(vinyl alcohol) in vitrification solution. Cryobiology 2009b;59:83-89.

265. Wang Y, Dubin PL. Observation of Ficoll charge using size-exclusion chromatography. J Chromatogr A 1998;800:181-185.

266. Wang YB, Lou Y, Luo ZF, Zhang DF, Wang YZ. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by polyvinylpyrrolidone K-30 and protective effect of alpha-tocopherol. Biochem Biophys Res Commun 2003;308:878-884.

267. Weng L, Li W, Zuo J. DSC determination of partial ternary phase diagrams of methanol/sodium chloride/water and propylene glycol/sodium chloride/water and their applications for synthesized diagrams. Thermochim Acta 2011;512:225-232.

268. Wharton DA, Block W. Differential scanning calorimetry studies on an Antarctic nematode (*Panagrolaimus davidi*) which survives intracellular freezing. Cryobiology 1997;34:114-121.

269. Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature 1971;233:125-126.

270. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. Science 1972;178:411-414.

271. Wilmut I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet Rec 1973;92:686-690.

272. Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, et al. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. Biophys J 2007;93:4225-4236.

273. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology 2004;48:146-156.

274. Wowk B, Darwin M, Harris SB, Russell SR, Rasch CM. Effects of solute methoxylation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions. Cryobiology 1999;39:215-227.

275. Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, et al. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. Cryobiology 2000;40:228-236.

276. Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM, Simmons HA. Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. Theriogenology 2008;70:725-745.

277. Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. Mol Reprod Dev 1999;53:8-18.

278. Xia HY, Vijayaraghavan B, Belak S, Liu LH. Detection and Identification of the Atypical Bovine Pestiviruses in Commercial Foetal Bovine Serum Batches. Plos One 2011;6.

279. Xie G, Timasheff SN. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. Biophys Chem 1997;64:25-43.

280. Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. Hum Reprod 2009;24:797-804.

281. Yoshimori T, Takamatsu H. 3-D measurement of osmotic dehydration of isolated and adhered PC-3 cells. Cryobiology 2009;58:52-61.

282. Yu XL, Deng W, Liu FJ, Li YH, Li XX, et al. Closed pulled straw vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. Theriogenology 2010;73:474-479.

283. Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984;42:293-296.

284. Zeron Y, Sklan D, Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. Mol Reprod Dev 2002;61:271-278.

# *Publications*

# Articles dans des revues internationales

**Bruyère P.**, Baudot A., Guyader-Joly C., Guérin P., Louis G., Buff S. Improved cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. Theriogenology, 2012, In Press.

**Bruyère P.**, Baudot A., Joly T., Commin L., Guérin P., Louis G., Buff S. A chemically defined medium for rabbit embryo cryopreservation. PLoS ONE, En révision.

Commin L., Buff S., Rosset E., Galet C., Allard A., **Bruyere P.**, Joly T., Guérin P., Neto V. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. Reproduction Fertility and Development, 2012;24,461-471.

# Communications orales

**Bruyère P.**, Baudot A., Guérin P., Louis G., Buff S.
Cryoconservation des embryons bovins: utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage pour le choix de substituants chimiquement définis aux produits d'origine animale.
6ème Congrès de la Société Française de Bioingéniérie Cellulaire et Tissulaire, 28-30 septembre 2011, Reims, France.

**Bruyère P.**, Baudot A., Guérin P., Louis G., Buff S.
Embryo's cryopreservation in cattle: Physical approach of foetal calf serum's influence on cryopreservation solutions properties.
47$^{th}$ annual meeting of the society of cryobiology, 17-20 juillet 2010, Bristol, UK.

**Bruyère P.**, Baudot A., Guérin P., Louis G., Buff S.
Etude des propriétés physiques des liquides de cryoconservation pour embryons bovins. Journée scientifique des doctorants de VetAgro Sup, 26 mai 2011, Marcy l'Etoile, France.

**Bruyère P.**, Baudot A., Guérin P., Louis G., Buff S.
Cryoconservation des embryons bovins : Utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage pour le choix de substituants chimiquement définis aux produits d'origine animale.
Journée scientifique des doctorants de VetAgro Sup, 20 octobre 2011, Lempdes, France.

# Posters

**Bruyère P.**, Baudot A., Guyader-Joly C., Guérin P., Joly T., Louis G., Buff S.
A chemically defined substitute to products of animal origin improves viability of *in-vitro* produced bovine embryos after slow-freezing.
17th International Congress on Animal Reproduction, 29 juillet-2 août 2012, Vancouver, Canada.

**Bruyère P.**, Baudot A., Guérin P., Louis G., Buff S.
Cryoconservation des embryons bovins: utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage pour le choix de substituants chimiquement définis aux produits d'origine animale.
6ème Congrès de la Société Française de Bioingéniérie Cellulaire et Tissulaire, 28-30 septembre 2011, Reims, France.

# Chapitre d'ouvrage

Neto V., Joly T., Commin L., **Bruyère P.**, Baudot A., Louis G., Guerin P., Buff S. New Approaches of Ovarian Tissue Cryopreservation from Domestic Animal Species in Cryopreservation / book 2. Editeur: Katkov I. Rijeka (Croatia): Intech. 205-236.

# Autres publications (hors thèses)

**Bruyère P.**, Hétreau T., Ponsart C., Gatien J., Buff S., Disenhaus C., Giroud O., Guérin P. Can video cameras replace visual estrus detection in dairy cows? Theriogenology, 2012;77,525-530.

Guérin P., Rosset E., Rey M., Febvay G., **Bruyère P.**, Corrao N., Neto V., Buff S. Amino acids in cat Fallopian tube and follicular fluids. Theriogenology, 2012;77,558-562.

Hetreau T., Giroud O., Ponsart C., Gatien J., Paccard P., Badinand F., **Bruyère P.** [Poster]
Simplifier la detection des chaleurs des vaches laitières grâce à la vidéosurveillance : une étude dans les races abondances et montbéliardes.
17ème journées 3R, 8-9 Décembre 2010, Paris, France

**Bruyère P.**, Hetreau T., Ponsart C., Buff S., Disenhaus C., Giroud O., Guérin P. [Communication]
Oestrous detection in cow with video cameras: a preliminary study.
EBF 2009, 1-3 Décembre 2009, Marseille, France.

Available online at www.sciencedirect.com
SciVerse ScienceDirect
Theriogenology
Theriogenology 78 (2012) 1294–1302
www.theriojournal.com

# Improved cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium

P. Bruyère[a,*], A. Baudot[b], C. Guyader-Joly[c], P. Guérin[a], G. Louis[b], S. Buff[a]

[a] *Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP 2011.03.101, ICE, F-69280, Marcy-l'Étoile, France*
[b] *Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, F-75270, Paris, France*
[c] *UNCEIA, F-38300, Chateauvillain, France*

Received 6 April 2012; received in revised form 24 May 2012; accepted 25 May 2012

**Abstract**

This study evaluates a new synthetic substitute (CRYO3, Ref. 5617, Stem Alpha, France) for animal-based products in bovine embryo cryopreservation solutions. During the experiment, fetal calf serum (FCS) and bovine serum albumin (BSA) were used as references. A combination of a thermodynamic approach using differential scanning calorimetry and a biological approach using *in vitro*-produced bovine embryo slow-freezing was used to characterize cryopreservation solutions containing CRYO3, FCS and BSA. The CRYO3 and fetal calf serum (FCS) slow-freezing solutions were made from Dulbecco's phosphate-buffered saline containing 1.5 M ethylene glycol, 0.1 M sucrose and 20% ($v.v^{-1}$) of CRYO3 or FCS. The bovine serum albumin (BSA) solution was made by adding 0.1 M sucrose to a commercial solution containing 1.5 M ethylene glycol and 4 g $L^{-1}$ BSA. These solutions were evaluated using three characteristics: the end of melting temperature, the enthalpy of crystallization (thermodynamic approach) and the embryo survival and hatching rates after *in vitro* culture (biological approach). The CRYO3 and FCS solutions had similar thermodynamic properties. In contrast, the thermodynamic characteristics of the BSA solution were different from those of the FCS and CRYO3 solutions. Nevertheless, the embryo survival and hatching rates obtained with the BSA and FCS solutions were not different. Similar biological properties can thus be obtained with slow freezing solutions that have different physical properties within a defined range. The embryo survival rate after 48 h of *in vitro* culture obtained with the CRYO3 solution (81.5%) was higher than that obtained with the BSA (42.2%, P = 0.000 12) and FCS solutions (58%, P = 0.016). Similarly, the embryo hatching rate after 72 h of *in vitro* culture was higher with the CRYO3 solution (61.1%) than with the BSA (31.1%, P = 0.0055) and FCS solutions (36%, P = 0.018). We conclude that CRYO3 can be used as a chemically defined substitute for animal-based products in *in vitro*-produced bovine embryo cryopreservation solutions.
© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Differential scanning calorimetry; Animal-derived products; Fetal calf serum; Bovine serum albumin; IVP bovine embryo; Slow freezing

## 1. Introduction

Over the past decade, ovum pick-up and *in vitro* embryo production have become increasingly common techniques in the cattle breeding industry for the commercial breeding of elite animals [1,2]. *In vitro* embryo technology has great potential for enhancing genetic selection, improving fertility and allowing for the production of "value-added" embryos with gender selection or detection of specific gene alleles [3,4]. While the number of fresh *in vitro*-produced (IVP) bovine embryos transferred worldwide has increased 11-fold dur-

* Corresponding author. Tel: (+33) 4 78 87 26 19; fax: (+33) 4 78 87 67 88.
*E-mail address:* pierre.bruyere@vetagro-sup.fr (P. Bruyère).

0093-691X/$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.025

# CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS BOVINS
## Utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage pour le choix de substituants chimiquement définis aux produits d'origine animale

P. Bruyère, A. Baudot, P. Guérin, G. Louis, S. Buff
Université de Lyon, UPSP ICE 'Interaction Cellule Environnement' - Equipe Cryobio, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France
cryobio@vetagro-sup.fr
INSERM U698, Sorbonne Paris Cité, Paris Cedex 18, France

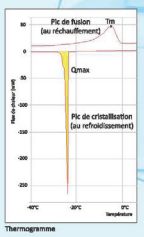
### Etat des lieux et objectif

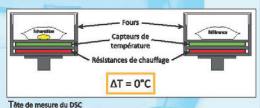
La majorité des milieux utilisés actuellement pour la cryoconservation d'embryons bovins contient des composants macromoléculaire d'origine animale. Le risque sanitaire qui en découle rend nécessaire la recherche d'alternative. Cette étude a donc pour objet l'évaluation **thermodynamique** d'un **substituant potentiel** dont la composition est **chimiquement définie** et ne présente **aucun composé d'origine animale**.

## Matériel

### Notre approche : La Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)

La DSC permet de mesurer certaines propriétés thermodynamiques caractéristiques des solutions cryoprotectrices. Son principe est de maintenir une température constante entre 2 fours quelles que soient les transitions de phase pouvant survenir dans l'échantillon ce qui permet donc de les caractériser.



Tête de mesure du DSC

Dans cette étude, 2 grandeurs thermodynamiques ont été caractérisées :
- **Tm** (Température de fin de fusion) lors d'un réchauffement lent (2,5°C/min)
- **Qmax** (Chaleur de solidification) lors d'un refroidissement lent (-2,5°C/min)

### Elaboration des solutions de cryoconservation testées

- Elaboration d'une **solution mère** sans composant macromoléculaire à partir de données bibliographiques :
  - D-PBS
  - éthylène glycol (1.5M)
  - sucrose (0.1M)
  - pénicilline (100 UI/mL)
  - streptomycine (0.1 mg/mL)
- Choix de 3 références de **sérum de veau fœtal (SVF)** chez 3 fournisseurs différents (Sigma, Fisher Scientific et VWR)
- Choix d'un **substituant** potentiel à la composition chimiquement définie
- Elaboration de solutions de cryoconservation par ajout de 20% de SVF ou de substituant à la solution mère

## Résultats

### Etude préliminaire :
**Comparaison des propriétés thermodynamiques de la solution mère et de solutions commercialisées pour la cryoconservation d'embryons bovins**

**Objectif** : Valider la composition choisie pour la solution mère

**Conclusion :**
- Qmax et Tm dans les mêmes ordres de grandeurs
- ➔ **Validation de la composition de la solution mère**

| Solution testée | $T_m$ (°C) | $Q_{max}$ (%) |
|---|---|---|
| Solution UNCEIA (n = 2) | -6,68 ± 0,76 | 51,90 ± 1,85 |
| VIGRO® (n= 2) | -6,78 ± 0,08 | 56,72 ± 0,57 |
| Solution IMV (n = 2) | -6,09 ± 0,42 | 54,87 ± 0,62 |
| Solution mère (n = 2) | -6,46 ± 0,48 | 54,90 ± 1,09 |

moyenne ± ecart type
n = nombre de répétitions

### Etude des sérums de veau fœtal et du substituant potentiel

#### Première partie :
**Comparaison des caractéristiques thermodynamiques de 9 références de SVF**

**Objectif :** Evaluer l'homogénéité des propriétés thermodynamiques de différents SVF par rapport à la congélation

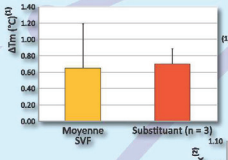
| SVF | $\Delta T_m$ (°C) (1) | $RQ_{max}$ (2) |
|---|---|---|
| SIGMA 2442 (n = 3) | 0,82 ± 0,51 | 1,06 ± 0,026 |
| SIGMA 9665 (n = 3) | 1,23 ± 0,13 | 1,05 ± 0,040 |
| SIGMA 7524 (n = 3) | 0,36 ± 0,68 | 1,05 ± 0,011 |
| GIBCO 056 (n = 3) | 0,47 ± 0,59 | 1,07 ± 0,019 |
| GIBCO 133 (n = 3) | 0,77 ± 0,59 | 1,06 ± 0,010 |
| GIBCO 036 (n = 3) | 0,88 ± 0,47 | 1,08 ± 0,019 |
| VWR 181 0 (n = 3) | 0,7 ± 0,46 | 1,06 ± 0,029 |
| VWR 181 D (n = 3) | 0,45 ± 0,12 | 1,05 ± 0,030 |
| VWR 181 L (n = 3) | 0,16 ± 0,82 | 1,05 ± 0,036 |
| **Moyenne SVF** | **0,65 ± 0,54** | **1,06 ± 0,024** |

moyenne ± écart type
n = nombre de répétitions

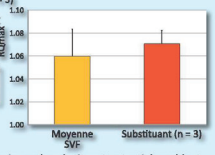
**Conclusion :**
- **Pas de différence significative** entre les différentes références
- Cependant, existence de différences importantes entre les sérums SIGMA 9665 et VWR 181 D

#### Deuxième partie :
**Comparaison des caractéristiques thermodynamiques du substituant potentiel et des caractéristiques moyennes des SVF**

**Objectif :** Evaluer si les propriétés thermodynamiques du substituant sont équivalentes à celles des SVF




(1) ΔTm (°C) = Tm (solution mère + composé) − Tm (solution mère)
n = nombre de répétitions

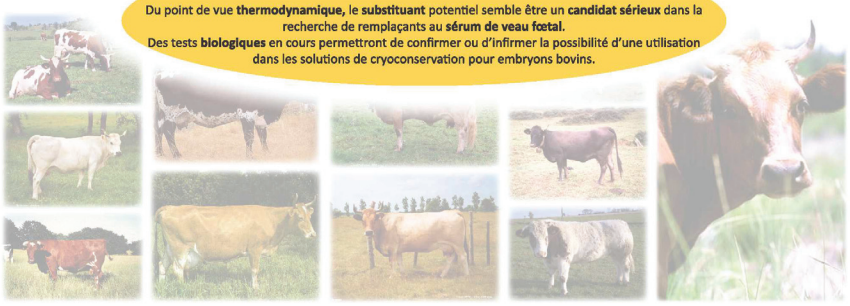



(2) $RQmax = \frac{Qmax\ (solution\ mère + composé)}{Qmax\ (solution\ mère)}$
n = nombre de répétitions

**Conclusion :** Les propriétés thermodynamiques du substituant potentiel semblent **équivalentes** aux propriétés thermodynamiques moyennes des SVF

### Conclusion

Du point de vue **thermodynamique,** le **substituant** potentiel semble être un **candidat sérieux** dans la recherche de remplaçants au **sérum de veau fœtal.**
Des tests **biologiques** en cours permettront de confirmer ou d'infirmer la possibilité d'une utilisation dans les solutions de cryoconservation pour embryons bovins.



**Evaluation thermodynamique et biologique d'un substituant synthétique aux produits d'origine animale dans les solutions de cryoconservation pour embryons de mammifères**

Plusieurs composés présents dans les solutions de cryoconservation pour embryons sont source de préoccupations : soit du point de vue sanitaire à cause de leur origine animale, soit du fait de leur rôle potentiellement mutagène, notamment pour certains cryoprotecteurs pénétrants. Leur retrait ou leur substitution par des composés chimiquement définis pourrait donc constituer une amélioration sensible des techniques de cryoconservation des embryons. C'est dans ce cadre de réflexion que s'inscrit notre travail.

Souvent, la conception et la mise en œuvre des protocoles de cryoconservation sont empiriques. Il en résulte de nombreuses variations entre les études qui rendent la comparaison des résultats obtenus d'autant plus difficile. Dans notre démarche, deux approches complémentaires ont été associées :

- la première, physique, s'appuie sur l'utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) pour standardiser la comparaison des différentes solutions de congélation lente. Ainsi, les propriétés thermodynamiques de solutions contenant un substituant défini ont été caractérisées et comparées à celles de solutions contenant des produits de référence (sérum de veau fœtal ou albumine bovine sérique) ;
- la seconde, biologique, a consisté à congeler des embryons de lapins produits *in vivo* et des embryons bovins produits *in vitro*, puis à analyser les taux de survie après culture *in vitro* et/ou transferts. Cette approche a permis d'objectiver les propriétés biologiques des solutions ainsi définies.

Nos résultats confirment qu'il est judicieux d'utiliser une approche thermodynamique pour sélectionner des molécules chimiquement différentes des composés habituellement utilisés.

**Mots clés**

Congélation lente, substituant, produits d'origine animale, calorimétrie différentielle à balayage, cryobiologie, embryons de lapins, embryons de bovins produits *in vitro*

**Discipline**

Biotechnologies de la reproduction

**UPSP I.C.E. – Equipe Cryobiologie**

VETAGRO SUP - Campus Vétérinaire de Lyon
1 Avenue Bourgelat
F-69280 Marcy l'Etoile