



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A01N 1/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/56246 (43) Date de publication internationale: 17 décembre 1998 (17.12.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01190 (22) Date de dépôt international: 10 juin 1998 (10.06.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/07311 10 juin 1997 (10.06.97) FR (71)(72) Déposant et inventeur: LEGRAND, Emmanuel [FR/FR]; Les Rouges Verts, F-61200 Sévigny (FR). (74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: IMPROVEMENTS TO METHODS FOR PREPARING EQUINE EMBRYOS FOR CRYOPRESERVATION (54) Titre: PERFECTIONNEMENT AUX PROCEDES DE PREPARATION D'EMBRYONS D'EQUIDES EN VU DE LEUR CRYOCONSERVATION (57) Abstract The invention concerns a method for preparing an equine embryo consisting in, previously to subjecting said embryo to the action of cryoprotectant(s), in subjecting it to a suitable treatment to eliminate the embryonary capsule or to increase said capsule permeability, in order to reinforce the subsequent action of said cryoprotectant(s). Preferably, the embryonary capsule is destroyed or simply made more permeable by a treatment based on collagenase or trypsin. (57) Abrégé Le procédé de préparation d'embryon d'équidé en vue de sa cryoconservation consiste: avant de soumettre ledit embryon à l'action d'agent(s) cryoprotecteur(s), à lui faire subir un traitement approprié pour supprimer la capsule embryonnaire ou pour augmenter la perméabilité de cette capsule, en vue de renforcer l'action ultérieure dudit ou desdits agents cryoprotecteurs. De préférence, la capsule embryonnaire est détruite ou simplement rendue plus perméable par un traitement enzymatique à base de collagénase ou de trypsine.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PERFECTIONNEMENT AUX PROCEDES DE PREPARATION D'EMBRYONS D'EQUIDES EN VUE DE LEUR CRYOCONSERVATION

La présente invention concerne le domaine de la conservation des embryons par le froid ; elle concerne plus particulièrement un perfectionnement aux procédés de préparation des embryons d'équidés pour leur cryoconservation (congélation ou vitrification), notamment en vue d'une transplantation ultérieure.

La congélation embryonnaire lors des transferts d'embryons présente de nombreux avantages. Elle permet, entre autre, de supprimer l'obligation de synchroniser les cycles oestriques entre la donneuse et la receveuse ; elle facilite le transport des embryons sur de longues distances et elle rend également possible la création de banques d'embryons, en particulier pour des animaux d'exception ou en voie de disparition.

Après les premiers succès dans les années 1970, la congélation des embryons est maintenant devenue une technique de routine chez les ruminants domestiques, notamment les bovins.

Des travaux parallèles réalisés dans le domaine équin ont permis d'aboutir aux premières naissances de poulains issus du transfert d'embryons congelés dans le début des années 1980.

D'un point de vue biologique, la fécondation de l'embryon équin se produit dans l'oviducte, à la jonction entre l'ampoule et l'isthme, généralement 12 heures après l'ovulation. L'embryon se développe alors dans l'oviducte ; il passe du stade zygote unicellulaire, d'une taille de 100 à 160 μm , au stade «morula» à partir de 16 à 32 cellules (150 à 200 μm). Les divisions mitotiques se font d'abord simultanément dans les différents blastomères, puis de façon de plus en plus asynchrones. La phase de développement de l'embryon équin dans l'oviducte dure 5 jours environ.

Le stade «blastocyste» succède au stade «morula» environ au moment où l'embryon passe dans l'utérus. C'est à ce stade qu'a lieu la différenciation entre deux populations cellulaires : le trophoblaste et la masse cellulaire interne (MCI) qui donnera le fœtus.

A ce stade, l'embryon se compose d'une cavité liquidienne (le blastocoele), entouré d'une couche cellulaire (le trophoblaste), auprès de laquelle se situe la masse cellulaire interne (MCI). A la périphérie de l'embryon, deux structures acellulaires peuvent s'observer : la zone

5 pellucide et la capsule.

La zone pellucide a une épaisseur de l'ordre de 15 à 30 µm ; elle est constituée d'une couche interne, dense, avec un petit nombre de fins canaux, et d'une couche externe comportant de larges lacunes. Cette zone pellucide est présente sur l'ovocyte et elle disparaît vers le 7^{ème} ou le

10 8^{ème} jour.

La capsule est caractéristique des embryons d'équidés. Elle se forme environ dans les 8 heures après l'entrée de l'embryon dans l'utérus, entre le trophoblaste et la zone pellucide. Cette capsule est de nature glycoprotéique ; son épaisseur augmente régulièrement jusqu'à un pic

15 vers le 18^{ème} jour ; elle décline ensuite jusqu'à disparition vers le 22^{ème} jour, à peu près au moment où l'embryon se fixe dans l'utérus.

La récolte des embryons en vue de leur congélation doit être réalisée avant qu'ils ne se fixent dans l'utérus. Le moment adéquat est évalué, après la saillie ou l'insémination, par palpation transrectale et

20 selon les données d'un examen par échotomographie.

Cette récolte peut se faire très tôt après la fécondation, au niveau de l'oviducte, mais cela nécessite alors une opération chirurgicale traumatisante pour l'animal. L'autre solution consiste à attendre que l'embryon ait atteint l'utérus (au-delà du 6^{ème} jour après la fécondation) et

25 à travailler par la voie vaginale, au moyen d'une sonde de récolte adaptée, conformément à la technique de LAGNEAUX D. et al. (1988 «la transplantation embryonnaire chez la jument, CEREOPA, 14^{ème} journée 163-181). Cette sonde permet l'introduction d'un milieu de collecte dans l'utérus (par exemple milieu Dubelcco's phosphate buffered saline (PBS)

30 + 2 g/l d'albumine sérique bovine, disponible chez I.M.V. (Instrument de Médecine Vétérinaire) B.P. 81, 61 L'AIGLE (France)), puis sa récupération avec le ou les possibles embryons. Le milieu de récolte est observé à la loupe binoculaire et, en cas de découverte d'embryon(s),

celui-ci ou ceux-ci sont isolés dans une cupule contenant le même milieu (PBS + albumine).

5 L'embryon est ensuite «préparé» pour supporter l'opération ultérieure de congélation. Cette préparation consiste à le soumettre à l'action d'agents cryoprotecteurs destinés notamment à éviter la formation de cristaux intracellulaires lors de la descente en température. Les agents cryoprotecteurs utilisés peuvent être choisis parmi le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol, ou encore le 1,2 propanediol ; ils sont utilisés à des concentrations de l'ordre de 1 à 2M, pendant des temps de 10 l'ordre de 10 mn à 30 mn (ces temps et concentrations sont adaptés selon l'efficacité de protection désirée tout en prenant en compte la possible toxicité des produits). De préférence, l'embryon est soumis à différents bains de cryoprotecteurs en concentration croissante.

15 L'embryon est ensuite conditionné dans une paillette plastique avec une petite quantité du milieu correspondant au dernier bain d'agent cryoprotecteur et cette paillette est déposée dans la cuve d'un congélateur programmable à une température de l'ordre de -7°C. Après un temps d'équilibration de l'ordre de 5 à 10 mn, la cristallisation du contenu est induite par contact avec une tige métallique préalablement 20 refroidie dans de l'azote liquide (-196°C). Après un nouveau temps d'équilibration thermique, le programmeur du congélateur fait descendre celui-ci jusqu'à une température de l'ordre de -30°C/-35°C, à raison de -0,1 à 1°C par minute ; à cette température, la paillette est immergée dans l'azote liquide, puis stockée dans une cuve.

25 La décongélation, avant transfert, est obtenue en plongeant la paillette pendant 1 mn dans un bain-marie à 37°C ; on sort l'embryon et l'opération de retrait de l'agent cryoprotecteur est réalisée par une succession de dilutions dans des bains de concentration décroissante.

L'embryon est alors prêt pour le transfert vers la jument receveuse. De 30 façon classique, deux techniques peuvent être utilisées : la première, chirurgicale, consiste à implanter l'embryon dans l'oviducte ; la seconde, non chirurgicale et correspondant mieux aux objectifs de transferts

commerciaux, consiste à déposer l'embryon dans l'utérus en passant le col à l'aide d'une sonde.

La technique qui vient d'être décrite est dérivée de celles utilisées depuis de nombreuses années chez les bovins, et qui permettent, chez
5 ceux-ci, l'obtention de taux de gestation à partir d'embryons congelés, supérieurs à 50 %.

Cependant, dans le domaine équin, les taux de gestation obtenus sont très faibles, seulement de l'ordre de 20 à 30 %.

Sans que l'on ait pu l'expliquer jusqu'à maintenant, l'utilisation de cette
10 technique de congélation chez les équidés entraîne bien souvent des nécroses importantes dans la Masse Cellulaire Interne et le trophoblaste de l'embryon, qui apparaissent à l'origine d'un nombre élevé d'avortements précoces.

L'objectif de la présente invention est de proposer une technique
15 perfectionnée de préparation des embryons en vue de leur cryoconservation, qui permet de diminuer les taux de nécrose liés à ces opérations et qui permet en conséquence de favoriser la gestation ultérieure, lors du transfert de l'embryon.

Le procédé conforme à la présente invention est basé sur la
20 présence de la capsule qui entoure l'embryon pendant la majeure partie du temps où ce dernier se trouve dans l'utérus de la donneuse, et sur l'hypothèse que la présence de cette capsule nuit aux opérations de préparation de l'embryon avant congélation.

Pour obtenir un taux de collecte intéressant, les embryons seront
25 récoltés assez tardivement ; ils seront en règle générale au stade blastocyste et entourés d'une capsule.

Dans la suite d'opérations classiques de préparation d'embryons d'équidés en vue de leur cryoconservation, le procédé selon l'invention prévoit, avant de soumettre ledit embryon à l'action d'agents
30 cryoprotecteurs, à lui faire subir un traitement approprié pour supprimer la capsule embryonnaire ou pour augmenter la perméabilité de cette capsule, en vue de renforcer l'action ultérieure dudit ou desdits agents cryoprotecteurs.

Selon une première façon d'opérer, la capsule est détruite ou simplement rendue plus perméable par un traitement chimique ou enzymatique approprié, par exemple à base de collagénase ou de trypsine. Les concentrations des produits utilisés et les temps de contact (traitements en bain) seront adaptés pour lyser au moins partiellement la capsule tout en tenant compte de la toxicité éventuelle des produits pour ne pas altérer l'embryon. Les sites d'action de la trypsine et de la collagénase étant différents, on peut aussi envisager l'utilisation d'un mélange de ces deux enzymes.

Selon une autre technique, la capsule est traitée mécaniquement : elle est enlevée partiellement ou totalement, ou bien elle subit une simple opération de perçage. Ce traitement mécanique est avantageusement précédé d'un traitement chimique ou enzymatique approprié pour fragiliser ladite capsule.

Exemple 1

L'embryon est récolté 5 à 8 jours après l'ovulation. Après isolement, il est placé dans un bain d'attente (milieu PBS + 2 g/l d'albumine sérique bovine ultrafiltré sur filtre de 0,2 μ m pour éviter les contaminations bactériennes).

L'embryon est ensuite placé dans une cupule de 2 ml contenant 1 à 2 ml d'une solution de trypsine à la concentration de 0,2 % (dilution dans un milieu PBS sans calcium ni magnésium), pendant 15 minutes et à température ambiante (de l'ordre de 23°C).

On obtient une destruction ou une fragilisation plus ou moins poussée de la capsule en fonction de la taille d'origine de celle-ci. Un «reste» affiné ou aminci de capsule peut persister autour de l'embryon ; il arrive que cette capsule se déchire intégralement par la simple action enzymatique ou bien on peut compléter ladite action enzymatique par une décapsulation mécanique réalisée au moyen d'une technique de micromanipulation.

Pour diluer l'enzyme et stopper son action, l'embryon est déposé dans trois ou quatre bains successifs de milieu ultrafiltré PBS + albumine, pendant une durée totale de 10 mn.

Au bout de ces 10 mn, l'embryon est placé dans le premier bain d'agent cryoprotecteur (glycérol 0,5 M pendant 15 mn), puis dans le second bain (glycérol 1 M pendant 15 mn) et enfin dans le troisième bain (glycérol 1,5 M pendant 15 mn).

5 L'embryon est alors monté en paillette, puis il subit les opérations habituelles pour obtenir sa congélation, de la façon décrite précédemment.

10 La décongélation est obtenue en plongeant la paillette pendant 1 mn dans un bain-marie à 37°C et on effectue ensuite les opérations de retrait de l'agent cryoprotecteur : l'embryon est placé dans un premier bain de glycérol 1 M + saccharose 0,25 M pendant 15 mn, puis dans un second bain de glycérol 0,5 M + saccharose 0,25 M pendant 15 mn, puis dans un troisième bain (saccharose 0,25 M pendant 15 mn) et enfin dans le milieu PBS + albumine (15 minutes).

15 L'embryon est alors prêt pour le transfert.

Exemple 2

On reproduit le protocole de traitement précédent mais on remplace la trypsine à 0,2 % par de la collagénase de type II à la concentration de 2,5
20 %, pendant 15 mn (dilution également dans un milieu PBS sans calcium et sans magnésium).

Résultats

a) Nécrose cellulaire

25 La nécrose cellulaire désigne les modifications structurales qui suivent la mort d'une cellule ; elle résulte de la dégradation progressive de la cellule par ses propres enzymes contenues dans les lysosomes.

Le pourcentage de cellules nécrotiques est représentatif des dégâts cellulaires causés par les manipulations et il reflète la viabilité de l'embryon.

30 Cet examen histologique est mené selon la technique décrite par J.F. BRUYAS - 1994 - «Contribution à l'étude de la congélation des embryons équins : une approche métabolique et cellulaire» - Mémoire de recherche Agrégation de pathologie de la reproduction - Ecole Nationale

Vétérinaire de NANTES, FRANCE. Il est réalisé avant l'opération de congélation pour déterminer les dégâts cellulaires liés au traitement préparatoire.

Le pourcentage observé de cellules nécrotiques a été le suivant :

- 5 a) embryons traités par la trypsine (conformément à l'exemple 1) : 11 %
(un embryon analysé)
- b) embryons traités par la collagénase (conformément à l'exemple 2) :
10,3 % (un embryon analysé)

10 Ces résultats sont à comparer avec les taux de nécrose d'embryons ayant suivi le même protocole de préparation, sans le traitement enzymatique :

- c) embryons sans capsule : 13,9 % (moyenne sur 6 embryons)
- d) embryons avec capsule : 30,6 % (moyenne sur 8 embryons)

15 On remarque donc que les embryons dont la capsule a été traitée par une enzyme subissent moins de dommages que les embryons qui ont conservé leur capsule intacte.

Ces embryons traités se comportent comme des embryons sans capsule.

b) Tests in-vivo

8 embryons ont été récoltés entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour après l'ovulation selon la méthode de LAGNEAUX et al. décrite ci-avant.

20 La répartition des embryons récoltés suivant leur âge est la suivante :

Age des embryons	nombre d'embryons
5,5 jours	1
6,5 jours	1
7,5 jours	2
8,5 jours	4

Les tailles des embryons récoltés sont les suivantes :

n° embryon	taille (µm)	n° embryon	taille (µm)
1	1020	5	187
2	714	6	1581
3	119	7	1105
4	442	8	187

Ces embryons ont été traités conformément à l'exemple 1 ci-dessus.

Les embryons n° 1 et n° 2 ont subi une décapsulation mécanique après le traitement enzymatique et la capsule des embryons n° 6 et n° 7 a été complètement lysée lors du bain d'enzymation.

5 Nous disposons donc de deux lots d'embryons :

- un lot n° 1 avec des embryons sans capsule (embryons n° 1, n°2, n° 6 et n° 7), et
- un lot n° 2 avec des embryons comportant une capsule seulement partiellement lysée (embryons n° 3, n°4, n° 5 et n° 8).

10 Après décongélation, la technique de transfert utilisée a été celle reportée dans TAINURIER D., BRUYAS J.F., DUMONT P., FIENI F., ESCOUFLAIRE P. (1989, « La transplantation embryonnaire chez la jument, Revue Med. Vet. 140, 1109-1115), qui consiste à déposer l'embryon derrière le col à l'aide d'une seringue de transplantation.

15 Le contrôle de la gestation a été réalisé par un échotomographe (scanner 100 de Pie Medical, Hospimédi 60790 POUILLY, FRANCE), à 14, 21 et 28 jours.

Les résultats des transferts figurent dans le tableau ci-dessous :

20

Lot	n° embryon	DG 14	DG 21	DG 28
1	1	+	-	-
1	2	-	-	-
2	3	-	-	-
2	4	+	(a)	(a)
25 2	5	+	-	-
1	6	+	+	+
1	7	+	+	+
2	8	+	+	+

30

DG = diagnostic de gestation (à 14, 21 et 28 jours respectivement)

(a) : la jument receveuse a été accidentée après le diagnostic de gestation à J14. Les examens ont alors été stoppés.

Les taux de gestation à 14, 21 et 28 jours sont les suivants :

DG	nombre de gestations/ nombre de transferts	%
à 14 jours	6/8	75 %
à 21 jours	3/7	43 %
à 28 jours	3/7	43 %

D'une manière globale, ces taux sont supérieurs à ceux obtenus avec les protocoles que l'on connaissait jusqu'à maintenant ; ils sont similaires aux taux obtenus après transfert d'embryons frais (58 % en moyenne sur les 10 dernières années (CLEMENT F., HOFFERER S., VINCENT P., 1995 « La transplantation embryonnaire chez la jument », Equ'idée mars-avril 17, 56-62).

Lot n° 1 (embryons sans capsule)

DG	nombre de gestations/ nombre de transferts	%
à 14 jours	3/4	75 %
à 21 jours	2/4	50 %
à 28 jours	2/4	50 %

Lot n° 2 (embryons avec capsule partiellement lysée)

DG	nombre de gestations/ nombre de transferts	%
à 14 jours	3/4	75 %
à 21 jours	1/3	33 %
à 28 jours	1/3	33 %

Ces résultats indiquent qu'il est possible d'obtenir des gestations avec des embryons n'ayant plus leur capsule, et qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats des embryons transplantés sans capsule et les embryons transplantés avec une capsule.

Les taux de gestation en fonction de l'âge sont les suivants :

Age	J14	J21	J28
5,5 jours	0/1	0/1	0/1
6,5 jours	1/1	1/1	1/1
7,5 jours	2/2	0/1	0/1
8,5 jours	3/4	2/4	2/4

Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une gestation à partir d'embryons congelés âgés de 7,5 jours et plus, en utilisant le procédé conforme à l'invention, alors que cela n'avait pratiquement pas été obtenu jusqu'à maintenant par les procédés connus.

Les taux de gestation en fonction de la taille sont les suivants :

Taille	J14	J21	J28
<200 μm	2/3	1/3	1/3
entre 200 et 500 μm	1/1	0/0	0/0
>500 μm	3/4	2/4	2/4
>1000 μm	3/3	2/3	2/3

Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une gestation à partir d'embryons congelés ayant une taille supérieure à 500 μm en utilisant le procédé conforme à l'invention, alors que cela n'avait pas été obtenu jusqu'à maintenant par les procédés connus.

L'ensemble des résultats obtenus montre bien l'importance de la capsule embryonnaire dans le processus de cryoconservation des embryons d'équidés. Le procédé conforme à l'invention améliore les taux de gestation à partir d'embryons congelés et il permet d'envisager le développement commercial de cette technologie.

Le traitement de la capsule embryonnaire permet de ne pas se préoccuper du moment de la récolte de l'embryon. En particulier, la récolte peut être réalisée assez tard ; on bénéficie ainsi d'un taux de collecte élevé et l'opération de congélation est réalisée sur des embryons

au stade «blastocyste» ce qui leur permet de mieux résister aux agressions des différents traitements.

- REVENDICATIONS -

- 1.- Procédé de préparation d'embryon d'équidé en vue de sa cryoconservation, lequel procédé consiste à préparer l'embryon, après récolte, en le soumettant à l'action d'agent(s) cryoprotecteur(s), puis à le conditionner en paillette avant de lui faire subir l'opération de cryoconservation proprement dite, caractérisé en ce qu'il consiste, avant de soumettre ledit embryon à l'action d'agent(s) cryoprotecteur(s), à lui faire subir un traitement approprié pour supprimer la capsule embryonnaire, ou pour augmenter la perméabilité de cette capsule, en vue de renforcer l'action ultérieure dudit ou desdits agents cryoprotecteurs.
- 2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste, après la récolte, à traiter la capsule embryonnaire par une action enzymatique avant de soumettre l'embryon à l'action du ou des agents cryoprotecteurs.
- 3.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste, après la récolte, à traiter la capsule embryonnaire en plongeant l'embryon dans un bain de collagénase.
- 4.- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il consiste, après la récolte, à traiter la capsule embryonnaire par de la collagénase 2,5 %, pendant 15 mn à la température ambiante.
- 5.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste, après la récolte, à traiter la capsule embryonnaire en plongeant l'embryon dans un bain de trypsine.
- 6.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il consiste, après la récolte, à traiter la capsule embryonnaire par de la trypsine 0,2 %, pendant 15 mn à la température ambiante.
- 7.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce qu'il consiste, après la récolte, à traiter la capsule embryonnaire par un mélange de collagénase et de trypsine.
- 8.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste, après la récolte, à enlever mécaniquement la capsule

embryonnaire avant de soumettre ledit embryon à l'action du ou des agents cryoprotecteurs.

5 9.- Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il consiste à enlever mécaniquement la capsule embryonnaire après avoir soumis l'embryon à un traitement chimique apte à fragiliser ladite capsule.

10.- Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il consiste à soumettre ledit embryon à un traitement enzymatique adapté pour fragiliser la capsule en vue de faciliter son enlèvement mécanique.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 98/01190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 98, Philadelphia, PA, US; abstract no. 217946, HOCHI S-I ET AL: "Influence of relative embryonic volumes during glycerol equilibration on the survival of frozen - thawed equine blastocysts." XP002058394 see abstract & JOURNAL OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 40 (3). 1994. 243-249., ----	
---	--	--

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 1998

Date of mailing of the international search report

09/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Decorte, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01190

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 97, Philadelphia, PA, US; abstract no. 024614, HINRICHS K: "Embryo transfer in the mare: A status report." XP002058395 see abstract & ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE 33 (1-4). 1993. 227-240. ISSN: 0378-4320, ----	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. BA95, Philadelphia, PA, US; abstract no. 128770, ORIOLE J G ET AL: "MUCIN-LIKE GLYCOPROTEINS IN THE EQUINE EMBRYONIC CAPSULE." XP002058396 see abstract & MOL REPROD DEV 34 (3). 1993. 255-265. CODEN: MREDEE ISSN: 1040-452X, ----	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. BA90, Philadelphia, PA, US; abstract no. 130438, HEHNKE K E ET AL: "FORMATION AND CHARACTERIZATION OF VESICLES FROM DAY-10 HORSE CONCEPTUSES." XP002058397 see abstract & THERIOGENOLOGY 34 (4). 1990. 709-720. CODEN: THGNBO ISSN: 0093-691X, ----	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. BA81, Philadelphia, PA, US; abstract no. 296, YAMAMOTO Y ET AL: "FROZEN STORAGE OF EQUINE EMBRYOS." XP002058398 see abstract & J FAC AGRIC HOKKAIDO UNIV 62 (2). 1985. 182-210. CODEN: JFAGAI ISSN: 0018-344X, -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e Internationale No

PCT/FR 98/01190

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A01N1/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 98, Philadelphia, PA, US; abstract no. 217946, HOCHI S-I ET AL: "Influence of relative embryonic volumes during glycerol equilibration on the survival of frozen - thawed equine blastocysts." XP002058394 voir abrégé & JOURNAL OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 40 (3). 1994. 243-249., --- -/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 septembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/10/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Decorte, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den .e Internationale No

PCT/FR 98/01190

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 97, Philadelphia, PA, US; abstract no. 024614, HINRICHS K: "Embryo transfer in the mare: A status report." XP002058395 voir abrégé & ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE 33 (1-4). 1993. 227-240. ISSN: 0378-4320, ---	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. BA95, Philadelphia, PA, US; abstract no. 128770, ORIOL J G ET AL: "MUCIN-LIKE GLYCOPROTEINS IN THE EQUINE EMBRYONIC CAPSULE." XP002058396 voir abrégé & MOL REPROD DEV 34 (3). 1993. 255-265. CODEN: MREDEE ISSN: 1040-452X, ---	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. BA90, Philadelphia, PA, US; abstract no. 130438, HEHNKE K E ET AL: "FORMATION AND CHARACTERIZATION OF VESICLES FROM DAY-10 HORSE CONCEPTUSES." XP002058397 voir abrégé & THERIOGENOLOGY 34 (4). 1990. 709-720. CODEN: THGNBO ISSN: 0093-691X, ---	
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. BA81, Philadelphia, PA, US; abstract no. 296, YAMAMOTO Y ET AL: "FROZEN STORAGE OF EQUINE EMBRYOS." XP002058398 voir abrégé & J FAC AGRIC HOKKAIDO UNIV 62 (2). 1985. 182-210. CODEN: JFAGAI ISSN: 0018-344X, -----	