

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
05 juillet 2018 (05.07.2018)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/122011 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A01N 1/02 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2017/083123

(22) Date de dépôt international :
15 décembre 2017 (15.12.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
16206907.4 27 décembre 2016 (27.12.2016) EP
BE20165981 27 décembre 2016 (27.12.2016) BE

(71) Déposant : UNIVERSITE DE LIEGE [BE/BE] ; Département Brevets, avenue Pré-Aily, 4, 4031 ANGLEUR (BE).

(72) Inventeurs : CONNAN, Delphine ; UNIVERSITE DE LIEGE, GIGA-R : Embryologie, Avenue de l'Hôpital 1, Bât. B34, 4000 LIEGE (BE). ECTORS, Fabien ; UNI-

VERSITE DE LIEGE, GIGA-Management : Plate-forme transgénique, Avenue de l'Hôpital 1, Bât. B34, 4000 LIEGE (BE). VANDERZWALMEN, Pierre ; UNIVERSITE DE LIEGE, Embryologie - Faculté de Médecine Veterinaire, Avenue de Cureghem, 6 - B43a, Quartier Vallée, 2, 4000 LIEGE (BE). GROBET, Luc ; UNIVERSITE DE LIEGE, Embryologie, Faculté de Médecine Veterinaire, Avenue de Cureghem, 6 - B43a, Quartier Vallée, 2 4000 LIEGE (BE).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: SINGLE-STEP VITRIFICATION METHOD

(54) Titre : METHODE DE VITRIFICATION EN UNE ETAPE



Figure 1

(57) Abstract: A method for the cryopreservation of biological material comprises a single step which consists in exposing the biological material to a vitrifying solution enriched with at least one cryoprotectant for less than 90 seconds, before cooling the biological material to a cryopreservation temperature.

(57) Abrégé : Méthode de cryopréservation de matériel biologique comprenant une étape unique d'exposition à une solution vitrifiante enrichie d'au moins un agent cryoprotecteur, pendant une durée inférieure à 90 sec préalablement au refroidissement à une température de cryopréservation du matériel biologique.

[Suite sur la page suivante]



WO 2018/122011 A1

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

METHODE DE VITRIFICATION EN UNE ETAPE

L'invention concerne une méthode de cryopréservation de matériel biologique, plus particulièrement une méthode de vitrification de matériel biologique en une étape.

5 **Etat de la technique**

Une méthode de cryopréservation est une méthode de conservation de matériel biologique à très basse température, typiquement 77K ou -196°C, soit la température de l'ébullition de l'azote liquide. On distingue la méthode de congélation lente et la méthode de vitrification.

10 La méthode de vitrification est une méthode de transformation sans cristallisation, d'un liquide en solide amorphe. Elle permet le refroidissement du matériel biologique et de leur milieu jusqu'à la température de -196°C sans apparition de cristaux de glace intra- ni extracellulaire. La méthode de vitrification implique une plongée brutale dans l'azote liquide du matériel biologique préalablement conditionné,
15 ce qui, en fonction de l'inertie thermique liée au matériel lui-même et à son conteneur, entraîne des vitesses de refroidissement allant de 900 à 20.000 °C par minute (Vanderzwalmen et al, 2010, gynecol. Obstet. Fertil., 38, 541-546). Par contre toute méthode de cryopréservation impliquant des vitesses de refroidissement lentes et de l'ordre de 0,5 à 4 °C par minute relève de la technologie de congélation lente qui
20 implique la cristallisation de l'eau extracellulaire.

La méthode de cryopréservation, en particulier la méthode de vitrification s'applique généralement à du matériel biologique du type cellules humaines, animales ou végétales, et plus particulièrement à des cellules à haute valeur individuelle telles que des cellules embryonnaires, des cellules germinales, des cellules souches, des
25 cellules pluripotentes induites, des cellules génétiquement modifiées, des cellules outils utilisées pour des applications telles que screening, diagnostic, études toxicologiques, thérapeutiques comme des vaccins ou applications similaires, mais aussi à des tissus, des organes, des embryons, des gamètes et leurs précurseurs ou tout

autre type de matière biologique. L'utilisation des cellules à haute valeur individuelle connaît un essor considérable dans les domaines de la thérapie régénérative, la thérapie génique, la reproduction médicalement assistée, le diagnostic, la recherche pharmaceutique et la production de vaccins. La cryopréservation de ces cellules est
5 essentielle pour leur stockage, leur transport, leur criblage et leur expansion aussi bien dans les domaines de la recherche que des biobanques, et à destination d'acteurs industriels ou d'utilisateurs dans les domaines thérapeutiques ou de la reproduction médicalement assistée.

La méthode de cryopréservation doit permettre pour être efficace, un taux de
10 reprise élevé, une stabilité des caractéristiques biologiques quelle que soit la durée de stockage dans le milieu de refroidissement tel l'azote liquide (LN2), être chimiquement et (micro-)biologiquement sûre, aisée à mettre en œuvre, automatisable et garante d'une sécurité sanitaire optimale. En effet, les efforts de stockage, de transport, de criblage et d'expansion préalable à leur utilisation en dépendent. Les contraintes de
15 qualité et sécurité applicables à la cryopréservation de cellules à visée thérapeutique sont par ailleurs énoncées dans des directives européennes (2004/03/EC; 2006/17/EC; 2006/86/EC).

Le but de toutes les méthodes de cryopréservation et donc aussi des méthodes de vitrification de matériel biologique est d'obtenir et de maintenir des conditions
20 intracellulaires compatibles avec l'obtention d'un état amorphe vitreux pendant les étapes de refroidissement et de réchauffement.

En ce qui concerne plus particulièrement la vitrification de matériel biologique, jusqu'à ce jour il était admis que la clé du succès dépendait d'un équilibre optimal entre (i) les vitesses de refroidissement et de réchauffement, (ii) la déshydratation cellulaire et (iii)
25 la pénétration de cryoprotecteurs (CPs) dans la matière biologique tel que les cellules ou embryons lors de leur exposition successive à plusieurs solutions vitrifiantes hypertoniques de plus en plus concentrées en agents cryoprotecteurs (CPs).

Une solution de vitrification est constituée de différents types de solutés. Elle peut comprendre un ou plusieurs cryoprotecteurs différents, comme par exemple du
30 propylène glycol, éthylène glycol, Ficoll, diméthyl-sulfoxyde (DMSO), glycérol, des oses

(saccharose ou diose, tréhalose, glucose, fructose, sucrose, mannose, saccharose,...ou leurs dérivés) ou leur mélange.

Une solution de vitrification peut comprendre également des solutés appelés à maintenir l'intégrité du matériel biologique comme par exemple des tampons
5 phosphates tel que KH_2PO_4 ou K_2HPO_4 en présence de KCl, NaCl ou autre sels, mais aussi les oses mentionnés ci-dessus tels que glucose, saccharose, dextrose, tréhalose ou leurs dérivés.

Enfin une solution de vitrification peut comprendre également des solutés tels que du sérum animal ou humain, tel que du Serum Foetal Bovin(FBS), du serum Foetal de veau
10 (FCS), de serumalbumine de bovin (BSA) utilisés pour leur apport protéique et leur effet cryoprotecteur.

Tous ces solutés jouent également un rôle dans le mécanisme d'équilibration vers une pression osmotique isotonique.

15 On qualifie une solution de vitrification d' hypertonique ou d'hyperosmotique par rapport à une autre solution du milieu intracellulaire hypotonique ou hypoosmotique séparées de la solution vitrifiante par une membrane biologique ou semi-perméable ; si la concentration en solutés de la solution vitrifiante hypertonique est telle qu'elle exerce une pression inférieure à celle exercée par la solution du milieu intracellulaire
20 (hypotonique) sur cette membrane. Il en résulte un appel d'eau du milieu intracellulaire vers la solution vitrifiante et/ou un échange de solutés à travers la membrane pour rétablir l'équilibre des pressions et tendre ainsi vers l'isotonicité ou l'isoosmolarité des deux solutions. On peut qualifier de normotonique une solution isotonique aux milieux intracellulaires dans des conditions physiologiques.

25 Dans Asian journal of Animal and Veterinary Advances 11(10) 2016, il est décrit un processus de vitrification en deux étapes conforme à la pratique usuelle selon l'état de la technique. Le matériel biologique, en l'occurrence des oocytes ou embryon, est d'abord soumis à une solution non-vitrifiante contenant des cryoprotecteurs pénétrants , puis est exposé à une 2^e solution vitrifiante comprenant de hautes

concentrations de cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants. Dans la première étape, les oocytes sont plongés par exemple dans une solution 10%(v/v) éthylène glycol et 10% de DMSO(v/v) dans un tampon phosphate contenant 18% Fetal Bovine serum (FBS), puis dans une deuxième solution vitrifiante comprenant 20% (v/v) d'éthylène glycol, 20%(v/v) de DMSO et 0.3M de tréhalose dans un tampon phosphate contenant 18% Fetal Bovine serum (FBS). Les deux étapes permettent une 5 équilibration lente entre les différents solutés de la solution intracellulaire et extracellulaire qui s'équilibrent à travers la paroi cellulaire. Cette équilibration est une réaction lente de l'ordre de 10 minutes (cfr p611 last paragraph left column)

10

Selon l'état de la technique, lors de la mise en œuvre de la méthode de vitrification, la dernière solution ou solution vitrifiante qui va être soumise à l'étape de refroidissement doit être une solution hypertonique vitrifiante (VS) c'est-à-dire une solution contenant un mélange de CPs pénétrants et/ou non pénétrants. Le rôle de la 15 VS est d'enrober la matière biologique telle que la cellule, l'embryon ou autre dans une gaine vitrifiante inhibant l'apparition de cristaux de glace extracellulaires. En pratique, la plupart des méthodes de vitrification comprennent plusieurs étapes d'exposition de la matière biologique telles que les cellules ou embryons, constituées de solutions de CPs pénétrants de plus en plus concentrés avant l'exposition finale dans la solution VS. 20 Ainsi Vanderzwalmen et al. dans un article de Human Reproduction d'avril 2013 décrit pour les oocytes et les embryons une première série d'expositions à des solutions non-vitrifiantes (nVSi) à concentration croissante en CPs pénétrants (de l'ordre de 3 à 4 M). Ensuite les oocytes et embryons sont exposés à une solution vitrifiante (VS) appelée également solution de vitrification (VS) comprenant une grande concentration de CPs 25 pénétrants (de l'ordre de 5 à 6,5M) et de CPs non pénétrants (de l'ordre de 0,5 à 1M) avant d'être plongés dans l'azote liquide. Il est connu et admis par l'homme de l'art que des concentrations de plus en plus élevées en agents cryoprotecteurs (CPs) lors des étapes d'expositions aux nVSi sont nécessaires pour préparer à un état de vitrification intracellulaire. Par contre, le mélange de CPs pénétrants et non-pénétrants 30 dans VS est responsable de la déshydratation cellulaire finale qui concentre les composants intracellulaires dont les sels, les protéines, les organites, les

polysaccharides et éventuellement les CPs qui auraient déjà pénétré dans la cellule au cours des étapes précédentes.

Parmi les agent cryoprotecteurs (CPs) non pénétrants (ou considérés comme tels vu la très faible perméabilité membranaire à leur rencontre), on compte par exemple le
5 Ficoll®, le saccharose, le tréhalose, le lactose, le mannitol, le maltose, le mannose et toute molécule appartenant à la famille des di- et trioses ou polysaccharides ou polyalcools ou autres molécules dérivées ou similaires.

Parmi les agents cryoprotecteurs pénétrants, on aura par exemple le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol (EG), le propylène glycol (PG), le polyéthylène glycol, le
10 triéthylène glycol, le glycérol et autres molécules dérivées ou similaires.

Si la présence de cryoprotecteurs (CPs) est nécessaire, il faut néanmoins admettre que tous les CPs sont potentiellement toxiques et particulièrement les CPs pénétrants. Leur toxicité dépend de la concentration utilisée, de la température comme de la durée d'exposition, de la tonicité du milieu, du mode de contact des cellules avec les produits
15 et enfin du type de cellule. Pour exemple, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le glycérol et plus spécialement le propylène glycol (PROH) peuvent former du formaldéhyde potentiellement toxique par des réactions non enzymatiques. De plus, le DMSO aurait un effet toxique en déstabilisant les protéines membranaires et en déplaçant l'eau liée qui y est associée. Si tout le monde s'accorde à dire que tous les CPs sont toxiques et
20 qu'il serait bénéfique de réduire leur concentration intracellulaire, il n'y a pas réellement de consensus quant à la manière de procéder pour cryopréserver des cellules ou des embryons sans les utiliser.

Résumé de l'invention

Nous avons maintenant trouvé une nouvelle méthode de vitrification dépourvue de la succession des étapes d'exposition aux solutions non-vitrifiantes (nVSi) propre aux
25 méthodes de vitrification connues, ce qui permet d'éviter aux cellules et embryons l'exposition progressive à des concentrations de plus en plus importantes de CPs pénétrants et toxiques.

La présente invention concerne en effet une méthode de cryopreservation, plus particulièrement une méthode de vitrification en une seule étape avec exposition du matériel biologique pendant une durée limitée dans le temps et avant le refroidissement, à une seule et unique solution vitrifiante (VS) comprenant des agents
5 CPs pénétrants et non pénétrants. La durée d'exposition est de préférence inférieure à 90 sec, et préférentiellement comprise entre 30 sec et 90sec. Le refroidissement est effectué à une température de cryopréservation du matériel biologique. La température de cryopréservation peut par exemple être la température de l'azote liquide. Les agents cryoprotecteurs (CPs) non-pénétrants sont présents en
10 concentration allant de 10% (v/v) à 60% (v/v), de préférence 60% dans la solution vitrifiante (VS).

Les agents cryoprotecteurs CPs pénétrants sont présents en concentration allant de 5 à 50% (v/v) dans la solution de vitrification (VS), de préférence 20% (v/v).

Du sérum animal ou humain comme l'albumine est également utilisé comme agent
15 cryoprotecteur dans des concentrations faibles allant de 0.1 à 1 % (v/v), de préférence 0,6% dans la solution vitrifiante (VS).

De manière surprenante, cette méthode de vitrification en une étape permet d'obtenir des résultats équivalents ou supérieurs à ceux obtenus avec les méthodes de
20 vitrification selon l'état de la technique combinant les expositions successives aux nVSi et à la VS.

Cette méthode présente aussi l'avantage d'éliminer les effets toxiques liés aux expositions prolongées aux CPs.

Le matériel biologique selon l'invention peut être par exemple tout type de cellules ou
25 tissus ou organes ou organisme mono ou pluricellulaire. Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le matériel biologique est un embryon, des cellules embryonnaires ou d'autres cellules apparentées ou dérivées, ainsi que des cellules pluripotentes induites et des cellules souches mésenchymateuses adultes de tendons.

Le matériel biologique préféré est l'embryon ou la cellule de mammifère normale (par exemple une cellule souche mésenchymateuse) ou génétiquement modifiée (par exemple une cellule pluripotente induite).

Le matériel biologique selon l'invention comprend aussi au niveau des embryons, leur
 5 zygotes, morulas ou blastocystes ; au niveau des cellules dérivées d'embryons, les cellules souches embryonnaires, cellules trophoblastiques ; au niveau des cellules souches adultes ou des cellules différenciées de différentes origines, les cellules de sang de cordon ombilical, cellules provenant de différents tissus tels le sang – *Peripheral Blood Monocytes* - , le muscle – myocytes ou myoblastes, cellules satellites- ,
 10 les ligaments et tendons –ténocytes, cellules souches mésenchymateuses-, les os - ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes -, le cartilage –chondroblastes et chondrocytes-, le cœur –cardiomyocytes, cardiomyoblastes-, le poumon et les voies respiratoires – pneumocytes, cellules ciliées- , le foie – hépatocytes-, le pancréas –cellules alpha et beta, cellules du pancréas exocrine-, la rate –splénocytes, cellules dendritiques- , les
 15 organes lymphoïdes, les reins, le tissu nerveux –neuroblastes et neurocytes, microgliocytes, cellules de Schwann, interneurones-, les vaisseaux – cellules endothéliales, cellules musculaires lisses-, les organes des sens –cellules de la cornée, neurosensorielles de la rétine, de l'oreille interne -, l'estomac –cellules de l'épithélium gastrique-, les intestins –entérocytes, cellules musculaires lisses, cellules nerveuses-,
 20 l'appareil reproducteur -cellules folliculeuses, de Sertoli, de Leydig, germinales primordiales, souches et gonocytes- , les parois des cavités-cellules mésothéliales-, le tissu conjonctif –cellules souches mésenchymateuses, fibroblastes- le thymus, la thyroïde, la parathyroïde, les surrénales), ainsi que les variants modifiés génétiquement ou reprogrammés de ces cellules.

25 Outre la simplification du protocole classique la méthode selon l'invention permet, avant le refroidissement pour la cryopréservation, d'exposer le matériel biologique tels que des embryons ou les cellules à une solution de vitrification (VS) unique pendant une période courte , de préférence inférieure à 90 secondes et préférentiellement entre 30 sec et 90 sec pour induire une déshydratation optimale sans passer par des
 30 solutions intermédiaires (nVSi) habituellement utilisées dans les techniques classiques de vitrification. Dans la méthode de vitrification selon l'invention, la solution

- hypertonique aussi appelée hyper osm otique responsable de cette déshydratation rapide permet la disparition de l'eau libre intracellulaire et la survie du matériel biologique suite à la vitrification induite par le refroidissement. Dans la méthode selon l'invention, il n'est plus nécessaire d'avoir recours à des agents cryoprotecteurs (CPs) qui entrent dans l'espace intracellulaire, ce qui présente l'avantage d'éliminer les effets toxiques, y compris génotoxiques, connus ou inconnus, à court, moyen ou long terme, liés aux expositions prolongées du milieu intracellulaire aux CPs. Dans la méthode selon l'invention, la vitesse de refroidissement apparaît beaucoup moins critique que dans la méthode classique selon l'état de la technique.
- 5
- 10 Dans un mode de réalisation de l'invention la méthode selon l'invention comprend en outre une étape de vitrification du matériel biologique sur support par immersion dans un milieu de refroidissement. Le milieu de refroidissement peut par exemple être l'azote liquide.
- 15 La méthode de cryopréservation selon l'invention comprend préférentiellement les étapes suivantes :
- a) mise en contact du matériel biologique avec la solution vitrifiante (VS) hypertonique ou hyper osmotique pendant une période limitée dans le temps, de préférence inférieure à 90 sec ;
- 20 b) dépôt sur support du matériel biologique issu de l'étape a);
- c) vitrification du matériel biologique sur support issu de l'étape b) dans le milieu de refroidissement qui est de préférence de l'azote liquide.
- Le matériel biologique peut ainsi être conservé par exemple dans l'azote liquide
- 25 comme milieu de refroidissement en condition aseptique ou non aseptique pendant une période illimitée.

Dans le cas d'une vitrification non aseptique, le matériel biologique est déposé sur un support, de préférence en forme de gouttière puis plongé directement dans le milieu de refroidissement qui est de préférence l'azote liquide, après une exposition de courte durée au sein de la solution vitrifiante (VS).

- 5 Dans le cas d'une vitrification aseptique le matériel biologique est déposé sur support après exposition à la solution vitrifiante (VS) et est introduit dans un conteneur ou une paille de protection scellée à une extrémité. La paille de protection est scellée à son autre extrémité lors de sa plongée dans le milieu de refroidissement qui est de préférence l'azote liquide.
- 10 La paille de protection doit être stérile et résistante au stockage à basse température. Elle est de préférence matière synthétique et peut être constituée de matériau plastique à base de polymères tel que le polypropylène ou à base de résine comme une résine ionomère. Le volume de la paille peut varier entre 250 µl et 500 µL. Il est de préférence de 250 µl.
- 15 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention la solution vitrifiante (VS) est préalablement refroidie à une température entre 5 et 1°C, de préférence 4°C avant d'être mise en contact avec le matériel biologique.

Après son séjour dans le milieu de refroidissement tel que l'azote liquide, le matériel biologique est ensuite récupéré par réchauffement jusqu'à la température ambiante.

- 20 Contrairement aux méthodes de vitrification selon l'état de la technique, où plusieurs bains successifs dans des solutions d'hypertonicités décroissantes sont nécessaires, la méthode selon l'invention ne comprend qu'une étape unique de réchauffement brutal du matériel biologique ayant subi l'étape de vitrification. Ce réchauffement brutal au départ de la température de refroidissement comme celle de l'azote liquide, à la
- 25 température ambiante de l'ordre de 18 à 25°C se fait à une vitesse allant de 10.000 à 30.000 degré par minute et préférentiellement 20.000 degré par minute.

Le réchauffement est effectué en plongeant le matériel biologique dans une solution normotonique telle que qu'une solution de rinçage d'embryons M2 (milieu de lavage selon Quinn, J.Reprod.Fert. 1982, sept :66(1) :161-8).

Brève description de la figure

La Figure 1. Est une photo d'une nichée de 9 souriceaux chimériques issus de l'injection de mESCs R1 vitrifiées en une étape selon l'invention dans des blastocystes C57BL/6.

Description détaillée de l'invention

- 5 L'invention est illustrée ci-après à travers plusieurs exemples qui ne doivent pas s'interpréter comme une limitation de l'invention revendiquée.

Matériel et méthodes

1° Production des Embryons

- Des souris consanguines FVB/N ou C57Bl/6J (Janvier Labs, France) femelles âgées de 5
10 semaines ont été superovulées par l'injection de 5 unités internationales (u.i.) de de gonadotropine présente dans le sérum de jument gravide (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin, PMSG) en intrapéritonéale (i.p.) suivie 46h plus tard par une injection ip de 5 u.i. de gonadotropine chorionique humaine (human Chorionic Gonadotrophin, hCG). L'injection d'hCG a été suivie immédiatement de l'accouplement des femelles
15 traitées avec des mâles de souche identique. Le lendemain de l'accouplement, les souris présentant un bouchon vaginal ont été euthanasiées par dislocation cervicale et leurs zygotes collectés. Seuls les embryons présentant 2 pronoyaux et un cytoplasme normal ont été inclus dans cette étude. Le développement *in vitro* des zygotes jusqu'au stade de blastocyste (jour 5 du développement *in vitro*) a été réalisé à 38°C, dans des
20 gouttes de 50 µL de milieu de culture pour embryons M16 sous huile (Whittingham, J.Reprod.Fertil Suppl.1971, 14 : 7-21), dans une atmosphère contrôlée de 5% de CO2 et saturée en humidité.

2° Utilisation des Embryons

- De manière générale, les embryons ont été dispersés aléatoirement en différents
25 groupes. Les embryons développés *in vitro* ont été utilisés aux stades d'une cellule (zygotes ; stade 1), de deux cellules (stades II) et de morulas. Après réchauffement, tous les embryons (sauf ceux utilisés pour les transferts) ont été cultivés *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste. Pour la validation de chaque expérience, chaque

manipulation comprenait un groupe contrôle non cryopréservé ainsi qu'un groupe vitrifié selon le protocole dit « classique » encore appelé protocole selon l'état de la technique décrit par Vanderzwalmen *et al* dans Human Reproduction (vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013), en plus des groupes tests. Pour rappel, la vitrification selon le

5 protocole classique consiste à exposer les embryons pendant 2 fois 3 minutes et à température ambiante aux solutions non vitrifiantes 1 et 2 (nVS1 et nVS2), avant de les laver dans de la solution de vitrification (VS) pré-refroidie à 4°C et de les déposer sur leur support. Cette dernière étape n'excède pas 1 minute. Les groupes tests ont été

10 directement exposés à la VS pré-refroidie avant d'être vitrifiés et / ou réchauffés selon différents protocoles comme décrits ci-dessous (dans les exemples 1 à 4). L'évaluation de la survie des embryons est réalisée une heure après le réchauffement, alors que le taux de développement est évalué au 5^e jour de la culture *in vitro* par dénombrement des blastocystes obtenus.

3° Culture des cellules souches embryonnaires murines (mESCs)

15 Des cellules souches embryonnaires murines (mESCs) de la lignée R1 (Nagy et al., PNAS, vol 90, p8424-8428, 1993) ont été mises en culture dans des boîtes de culture gélatinisées sans cellules feeders, dans un milieu et dans des conditions préservant leur pluripotence et leur potentiel de multiplication. Le milieu utilisé est tel que décrit dans le tableau 1 ci-dessous.

	%	ml
DMEM KO	81	40 ou 40,5*
SERUM	15	7,5
Na Pyruvate 100x	1	0,5
NEAA 100x	1	0,5
B-ME 10mM 100x	1	0,5
Pen-Strep-Glut 50x ou 100x	1	1,0 ou 0,5*
mLIF (murine Leukemia inhibiting factor)	/	0,025
TOTAL	100	50,0

20 Tableau 1. Composition du milieu de culture des mESCs.

A partir du troisième jour après le départ de la culture, le milieu est changé quotidiennement. Lorsque le développement le nécessite (70% de confluence), les cellules sont réparties à une densité conforme aux besoins de l'expérience dans de

nouvelles boîtes de cultures. Pour ce faire, les cultures sont rincées à l'aide de PBS sans Calcium ni Magnésium, et ensuite récoltées à l'aide de trypsine –EDTA à l'incubateur pendant 3 à 5 minutes afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène. L'activité de la trypsine est arrêtée à l'aide de 6 à 8 volumes d'une solution de lavage telle que

5 décrite dans le tableau 2 ci-dessous.

	%	ml
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	91	500
Newborn calf serum	10+/-1	50
Na Pyruvate 100x	1+/-0,1	5,5
NEAA (Non Essential Amino Acids) 100x	1+/-0,1	5,5
B-ME 10mM 100x	1+/-0,1	5,5
Pen-Strep-Glut 50 ou 100x*	1+/-0,1	5,5 ou 11*
TOTAL	100	572

Tableau 2 : composition du milieu de lavage des mESCs

La suspension de cellules lavées est centrifugée et le culot est remis en suspension dans du milieu de culture. Les cellules sont réparties dans de nouvelles boîtes de culture à une densité conforme aux besoins de l'expérience.

10 **4°Solutions cryoprotectrices utilisées dans les exemples selon l'invention**

Toutes les solutions cryoprotectrices nVSi utilisées dans les exemples sont préparées à partir d'une solution tampon de D-PBS (Sigma D-4031) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (FCS) pour culture cellulaire (provenant de sources commerciales (par exemple Fetal Bovine Serum de Gibco®). Les solutions nVS1 et nVS2 utilisées pour le

15 groupe de contrôle sont préparées de manière classique selon l'état de la technique et décrit par Vanderzwalmen *et al* dans Human Reproduction (vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013). La solution nVS1 contient 5% (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 5% (v/v) d'éthylène glycol (EG), alors que la solution nVS2 contient 10% (v/v) de DMSO et 10%

20 (v/v) d'EG.

La solution hyper osmotique VS utilisée à la suite des solutions nVSi selon la méthode classique de l'état de la technique, ou isolément dans la méthode selon l'invention est

constituée de 20% (v/v) de DMSO, de 20% (v/v) d'EG, de 0,5M de saccharose (Sigma S-1888) et de 25µM de Ficoll (Sigma F-8636). Les solutions de saccharose (S-1888) utilisées sont préparées à partir de tampon D-PBS (Sigma D-4031) additionné de 10% de sérum de veau fœtal.

5 **5°Comptages cellulaires après le réchauffement.**

Les mESCs sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer, immédiatement, 24 et 48 heures après leur réchauffement. La mortalité a été estimée à l'aide d'un test d'exclusion du bleu trypan.

10 **6°Méthode de vitrification en une étape selon l'invention**

Vitrification des embryons :

Pour la vitrification en une étape, les embryons par groupes de 4 à 6 sont prélevés de leur milieu de culture et sont déplacés dans une goutte de VS de 0,5 ml préalablement refroidie à 4°C. Après des expositions de durées variables dans la VS (30 ; 90 ; 120 ; 150 et 180 secondes pour l'expérience 1, 30 versus 150 secondes pour les expériences 2 ; 3 et 4b ; 50 secondes pour les expériences 3 et 4b), les embryons sont placés sur la gouttière du support de vitrification : VitriPlug (Vitrimed, Austria) dans le cas des vitrifications non aseptiques (exemples 1, 2, 3, 4a et groupes contrôle), et VitriSafe (Vitrimed, Austria) pour les vitrifications aseptiques (exemples 3 et 4b). Par vitrification aseptique on entend une vitrification sans contact direct du milieu et des embryons avec l'azote liquide. Lors des vitrifications aseptiques, ce support VitriSafe est introduit dans une paille de protection de 0,3 ml (CryoBioSystem) préalablement identifiée, lestée et scellée à une extrémité (il y a 2 compartiments dans les pailles de 0,3 ml. Ces 2 compartiments sont séparés par un piston en coton. Le grand compartiment de 0,3 ml est destiné à recevoir le VitriSafe® alors que l'autre est destiné à recevoir un lest (tige en inox enrobée d'un film plastique de couleur) entouré d'une étiquette d'identification). Pendant la plongée dans l'azote liquide, la seconde extrémité de la paille de protection est également scellée. Lors des vitrifications aseptiques aussi bien que non aseptiques, le refroidissement est accéléré en opérant des mouvements

tournants dans l'azote liquide afin d'éviter l'effet « Leidenfrost » entraînant une réduction de la vitesse de refroidissement par formation d'une couche gazeuse isolante en périphérie de la paille.

- Deux groupes contrôles sont traités en parallèle : un groupe d'embryons non
5 cryopréservés et un groupe vitrifié selon la méthode classique de l'état de la technique décrite dans Vanderzwalmen et al (Human Reproduction, 2013).

Vitrification des cellules souches embryonnaires :

- La vitrification est effectuée de manière aseptique pour la vitrification selon l'état de la technique et pour la vitrification en une étape selon l'invention. Les cellules en culture
10 sont récoltées comme décrit ci-dessus, un aliquot de suspension cellulaire est ensuite utilisé pour un comptage cellulaire, et éventuellement répartie en fractions en fonction de leur numération. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée, et le culot est remis en suspension dans 250 µl de solution VS préalablement refroidie à 4°C pendant 50 secondes. Pendant cette incubation, la suspension cellulaire est aspirée dans une
15 paille de 250 µl qui est scellée aux deux extrémités avant d'être plongée dans l'azote liquide de la même manière qu'expliqué ci-dessus pour les embryons.

7^oÉtape de réchauffement à la suite de la vitrification selon l'invention

- 20 Lors du réchauffement après une vitrification aseptique, et alors que la paille de protection est encore partiellement immergée dans l'azote liquide, l'extrémité scellée correspondant au compartiment où se trouve le VitriSafe® est coupée avec des ciseaux et le VitriSafe en est extrait. Sa gouttière supportant les embryons est plongée directement et immédiatement dans une goutte de 0,5 ml de saccharose 0,5M (groupe
25 contrôle) ou 0,25 M (groupes des exemples 1 et 4a) ou dans du milieu de culture M2 à température ambiante (exemples 2 et 4b). Cette dernière étape de la procédure de réchauffement par immersion est réalisée à température ambiante et est identique lors de l'utilisation des VitriPlug®. Elle est responsable du réchauffement ainsi que de la dilution immédiate de la VS.

8°Analyse statistique

Dans tous les exemples concernant les embryons, l'analyse statistique a été réalisée selon un modèle linéaire (analyse de variance) à l'aide du logiciel SAS. Seules les différences pour lesquelles la valeur de p est inférieure à 0,05 sont considérées comme significatives.

Exemples et résultats

Exemple 1 : Vitrification en une étape selon l'invention d'embryons aux stades I, II et de morulas : effet de la durée d'exposition à la VS

10 Des embryons sont récoltés au stade d'une cellule (zygote ; stade 1), selon la méthode de production décrite dans « *Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual* » 4th Edition, 2013 Behringer et al, CSH Press. Une partie de ces embryons sera affectée au groupe contrôle non cryopréservé et sert de référence à l'expérience. Toutes les expériences pour lesquelles ce groupe de référence nous a donné un pourcentage de

15 blastocystes inférieur à 90% ont été invalidées. Parmi les groupes d'embryons vitrifiés, un groupe est traité selon la méthode classique de l'état de la technique décrite dans Vanderzwalmen et al (Human Reproduction, 2013) et cinq autres groupes d'embryons sont exposés directement à la solution de vitrification (VS) décrite au point 3 pendant respectivement 30 sec, 90 sec, 120 sec, 150 sec et 180 sec avant le refroidissement.

20 Après cela les embryons sont placés par groupes de cinq (+ ou - 1) sur un support non aseptique (provenant de Vitrimed®) et plongés directement dans l'azote liquide pour y être conservés pendant une période prolongée allant généralement de un jour à une semaine.

Lors du réchauffement, tous les groupes, y compris le groupe contrôle vitrifié selon la

25 méthode classique décrite par Vanderzwalmen *et al* dans Human Reproduction (vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013), mais excepté le groupe contrôle non cryopréservé, sont amenés brutalement à une vitesse de 20.000°C par minute à la température ambiante en les plongeant dans une solution de saccharose (Sigma S-1888) diluée dans du PBS

(Sigma D4031) à la concentration de 0,25M. Les groupes d'embryons restent dans cette solution pendant une durée variable allant de 1 à 3 minutes.

Les embryons sont ensuite lavés dans le milieu M2 (milieu de lavage selon Quinn dans J.Reprod.Fert. 1982, sept: 66(1) :161-8) avant d'être mis en culture dans le milieu M16 (Whittingham, dans J.Reprod.Fertil Suppl.1971, 14: 7-21)). Seuls les embryons retrouvés sont pris en compte. Le taux de survie expérimental est calculé après une heure de culture. Par contre, le taux de développement est évalué au jour 5 du développement. Il s'agit du pourcentage de blastocystes obtenu et exprimé par rapport au nombre d'embryons retrouvés après le réchauffement.

10 La même expérience a ensuite été réalisée avec des embryons récoltés au stade zygote et développés *in vitro* jusqu'au stade de 2 cellules après 24 heures de culture.

La même expérience a ensuite été réalisée avec des embryons récoltés au stade zygote et développés *in vitro* jusqu'au stade morula (+/- 16 cellules) après 36 heures de culture.

15 Les résultats sont repris dans le Tableau 1 qui présente les taux de survie observés une heure après le réchauffement et les pourcentages de blastocystes observés au 5^{ième} jour de développement après vitrification en une étape des zygotes, stades II et des morulas.

20 Au cours de l'exemple 1, un total de 681 zygotes a été récolté à partir de 46 femelles superovulées.

Tableau 1 : Taux de survie 1 heure après le réchauffement (T0) et pourcentages de blastocystes observés après vitrification en une étape en fonction du stade de développement (stades zygote, II et morula) et de la durée d'exposition à la VS. Le réchauffement a été réalisé dans du saccharose 0,25M.

	Nb d'embryons	Nb d'embryons retrouvés (R)	% de survie (S) à T0 (S/R)	% de blastocystes (B) à J5 (B/R)	Nb de répliques
Zygotes					
Contrôle	18	18	100,0 (18)	77,8 (14) ^a	2
Vitrification	41	39	87,2 (34)	61,5 (24)	4

classique					
VS 30 sec	29	28	89,3 (25)	71,4 (20)	3
VS 90 sec	29	27	96,3 (28)	63,0 (17)	3
VS 120 sec	31	30	86.7 (27)	36.7 (11)	4
VS 150 sec	22	20	80.0 (18)	40.0 (8)	3
VS 180 sec	22	22	86.4 (19)	27.3 (6) ^b	3
Stades II					
Contrôle	40	40	100.0 (40) ^c	95,0 (38) ^e	3
Vitrification classique	30	28	92.9 (26)	67.9 (19)	4
VS 30 sec	51	39	79.5 (31)	51.3 (20)	5
VS 90 sec	31	31	77.4 (24)	61.3 (19)	4
VS 120 sec	27	27	96.3 (26)	63.0 (17)	3
VS 150 sec	26	26	96.2 (25)	50.0 (13)	3
VS 180 sec	25	25	44.0 (11) ^d	4.0 (1) ^f	3
Morulas					
Contrôle	43	43	100.0 (43) ^g	95.3 (41) ⁱ	4
Vitrification classique	68	62	91.9 (57)	87,1 (54)	7
VS 30 sec	34	32	100.0 (32)	84.4 (27)	5
VS 90 sec	34	32	81.3 (26)	62.5 (20)	4
VS 120 sec	25	25	80.0 (20)	68.0 (17)	4
VS 150 sec	27	27	85.2 (23)	70.4 (19)	3
VS 180 sec	28	28	39.3 (11) ^h	0,0 (0) ^j	3

Les valeurs avec des exposants différents sont significativement différentes : a:b = p<0,05; c:d = p<0,02; e:f = p<0,05; g:h = p<0,0005; i:j = p<0,0001.

5 A l'analyse de cet exemple 1, nous avons observé pour les zygotes que les taux de survie après 1 heure ne sont pas affectés par la durée d'exposition à la VS. Les meilleurs taux de développement en blastocystes sont obtenus avec les durées d'exposition, donc les concentrations intracellulaires en CPs (ICCPs), les plus basses : les groupes 30 et 90 secondes.

10 Concernant les stades II, les survies après 1 heure chutent avec des expositions de 180 secondes. Les taux de blastocystes obtenus au cinquième jour de culture sont semblables à ceux obtenus pour les zygotes, avec un optimum centré sur 90 secondes d'exposition, et deviennent très faibles avec des expositions de 150 et surtout 180 secondes.

15 Pour les morulas, de la même manière que pour les stades II, les taux de survie après 1 heure sont excellents jusqu'à 150 secondes, puis chutent drastiquement. Il en va de

même pour les pourcentages de blastocystes au 5^e jour, pour lesquels l'optimum est centré sur les expositions courtes. Ainsi, de manière surprenante, pour chaque stade étudié, les taux de développement sont les meilleurs pour les durées d'exposition à la VS les plus courtes où ils sont similaires à ceux obtenus dans les groupes témoins après

5 vitrification classique selon l'état de la technique. Cela démontre qu'une déshydratation brutale courte et en une étape selon l'invention induit une vitrification intracellulaire et n'est pas plus délétère qu'une déshydratation par paliers qui est chaque fois suivie d'une entrée de CPs suivis d'eau. Ainsi, la survie des embryons de souris est possible après des expositions à la VS aussi courtes que 30 secondes. Cela

10 signifie également que les embryons survivent à la vitrification malgré une concentration intracellulaire de CPs très faible voire nulle. En effet, les durées d'exposition les plus courtes à la VS (30 secondes) entraînent la déshydratation de la cellule sans permettre l'entrée de CPs ni d'eau, ce qui s'est traduit dans cet exemple par une efficacité supérieure de la vitrification (survie et développement) par rapport

15 aux expositions les plus longues qui permettent l'entrée de CPs suivis d'eau (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013).

Exemple 2 : Vitrification en une étape des stades I, II et de morulas: effets de la dilution en une étape de la VS dans du milieu sans saccharose (milieu M2 seul) lors du réchauffement, induisant une

20 **réhydratation cytoplasmique instantanée**

Lors du processus de vitrification classique selon l'état de la technique (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013), les CPs entrent dans la cellule au cours des différentes expositions aux solutions nVSi qui

25 précèdent l'exposition à la VS et le refroidissement. Lors du réchauffement, les cellules sont exposées à du saccharose, agent osmotiquement actif utilisé pour contrecarrer une entrée brusque et excessive d'eau dans le cytoplasme déshydraté contenant les CPs pénétrants entrés dans la cellule au cours des étapes d'exposition aux nVSi. Lors du processus de réchauffement qui suit une vitrification classique selon l'état de la

30 technique, l'absence de cette solution contenant du saccharose résulte en un

éclatement de la cellule suite à une entrée trop brutale et massive d'eau. Cette entrée d'eau en excès est uniquement liée à la présence de CPs pénétrants et osmotiquement actifs à l'intérieur de la cellule (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013).

- 5 Dans le cas de la vitrification selon l'invention, les embryons ne sont pas exposés aux nVSi. Il ne devrait donc pas y avoir d'entrée de CPs dans le cytoplasme, surtout si la phase de déshydratation liée à l'exposition à la VS est courte. Si cette hypothèse est exacte, en l'absence de CPs intracellulaires, le saccharose ne serait plus nécessaire pour empêcher l'entrée d'eau en excès lors du réchauffement. C'est pour vérifier cette
- 10 hypothèse que, au cours de l'exemple 2, un réchauffement direct dans du milieu M2 sans saccharose a été effectué.

Comme pour l'exemple 1, des embryons de souris sont vitrifiés aux stades zygote, 2 cellules et morula. Un groupe témoin non cryopréservé sert de référence à l'expérience et des groupes contrôle sont vitrifiés et réchauffés par la méthode de l'état de la

15 technique décrite dans Vanderzwalmen et al (vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013). Deux autres groupes d'embryons (zygotes, stades 2 et morulas) sont vitrifiés selon l'invention par exposition directe à la solution de vitrification (VS) pendant 30 sec ou 150 sec.

Après cela les embryons sont placés par groupes de cinq (+ ou -1) sur un support non

20 aseptique (VitriPlug, provenant de Vitrimed®) et plongés directement dans l'azote liquide pour y être conservés pendant une période prolongée allant généralement de un jour à une semaine.

Lors du réchauffement, le groupe contrôle vitrifié selon l'état de la technique (Vanderzwalmen *et al* dans Human Reproduction, 2013) est amené brutalement à une

25 vitesse de 20.000°C par minute à la température ambiante en les plongeant dans une solution de saccharose (Sigma S-1888) diluée dans du PBS (Sigma D4031) à la concentration de 0,5M. Ce groupe d'embryons reste dans cette solution pendant une durée variable allant de 1 à 3 minutes avant d'être lavés dans du milieu M2 (milieu de lavage selon Quinn, 1982) et d'être ensuite mis en culture dans du milieu M16

30 (Whittingham, J.Reprod.Fertil Suppl.1971, 14 : 7-21). Les autres groupes vitrifiés selon

l'invention sont également amenés brutalement à une vitesse de 20.000°C par minute à la température ambiante mais cette fois en les plongeant directement dans du milieu M2 (Quinn, 1982) avant d'être mis en culture dans du milieu M16 (Whittingham, J.Reprod.Fertil.Suppl. 1971 jun : 14 :7-21).

- 5 Le Tableau 2 présente, pour des zygotes, stades II et des morulas, les taux de survie observés 1 heure après le réchauffement et les pourcentages de blastocystes observés au 5^{ème} jour de développement après vitrification en une étape et réchauffement en une étape dans du milieu sans saccharose.

Un total de 526 zygotes a été récolté à partir de 25 souris et utilisés au cours de

- 10 l'exemple 2.

Tableau 2 : Taux de survie après 1 heure (T0) et de blastocystes à J5 après vitrification en une étape et réchauffement / réhydratation immédiate dans du milieu M2 sans saccharose (réchauffement en une étape).

	Nb d'embryons	Nb d'embryons retrouvés (R)	% de survie (S) à T0 (S/R)	% de blastocystes (B) à J5 (B/R)	Nb de répliques
<i>Zygotes</i>					
Contrôle	15	15	100,0 (15)	93,3 (14)	1
Vitrification classique	41	39	87,2 (34)	61,5 (24) ^b	4
VS 30 sec	52	48	91,7 (44)	58,3 (28) ^b	5
VS 150 sec	62	61	75,4 (46)	41,0 (25) ^b	4
<i>Stades II</i>					
Contrôle	41	41	100,0 (41)	100,0 (41)	2
Vitrification classique	30	28	92,9 (26)	67,9 (19)	4
VS 30 sec	32	31	96,8 (30)	80,6 (25)	3
VS 150 sec	45	44	72,7 (32)	63,6 (28)	3
<i>Morulas</i>					
Contrôle	35	35	100,0 (35) ^a	100,0 (35) ^c	2
Vitrification classique	68	62	91,9 (57)	87,1 (54)	7
VS 30 sec	53	53	100,0 (53)	96,2 (51)	3
VS 150 sec	52	52	61,5 (32) ^b	46,2 (24) ^d	3

- 15 Les valeurs avec des exposants différents sont significativement différentes : a:b = p<0,002 ; b:c = p<0,0005 ; c:d = p<0,0004.

A l'analyse de cet exemple 2, quel que soit le stade de l'embryon lors de la vitrification, le taux de survie à T0 ainsi que le taux de développement en blastocystes après 5 jours sont équivalents voire supérieurs (expositions de 30 secondes à la VS) pour le procédé
5 selon l'invention (vitrification en une étape et réchauffement en une étape sans saccharose) par rapport à la vitrification classique. Il apparaît donc que l'activité osmotique du saccharose lors du réchauffement après vitrification en une étape selon l'invention ne soit pas nécessaire, en particulier pour les expositions courtes à la VS (30
10 sec). L'immersion brusque dans une solution normotonique (M2) n'entraîne donc pas de mortalité cellulaire suite à leur gonflement. Ce n'est pas le cas lors de la méthode selon l'état de la technique, où un réchauffement direct dans du milieu sans saccharose diminue drastiquement la viabilité de l'embryon, suite à son gonflement trop important (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10,
2013).

15 Notre hypothèse selon laquelle, contrairement à la vitrification suivant l'état de la technique, la vitrification en une étape selon l'invention limite drastiquement voire annule l'entrée de cryoprotecteurs (CPs) dans les cellules se trouve ainsi vérifiée.

Par ailleurs, en conjonction avec l'exemple 1, cette expérience montre que le processus de vitrification en une étape suivi du réchauffement en une étape selon l'invention est
20 au moins aussi efficace que la vitrification selon l'état de la technique en ce qui concerne la viabilité et le développement des cellules, tout en assurant une réduction voire une suppression de leur contenu en cryoprotecteurs (CPs) potentiellement délétères.

Exemple 3 : Vitrification et réchauffement en une étape : effet de la
25 **nature du support : aseptique ou non aseptique.**

Les exemples précédents (1 et 2) ont démontré que la vitrification en une étape selon l'invention résulte en des concentrations intracellulaires en cryoprotecteurs (ICCPs) très basses voire nulles.

Un des dogmes de la vitrification intracellulaire selon l'état de la technique est inféré des propriétés de la vitrification des milieux aqueux : moins les CPs sont concentrés dans la cellule, plus les vitesses de refroidissement et de réchauffement doivent être élevées pour générer et maintenir l'état vitreux (Yavin et al., Hum Reprod. 2009

5 Apr;24(4):797-804).

Au cours de la vitrification en une étape selon l'invention, on s'attend donc à ce qu'une réduction des vitesses de refroidissement et de réchauffement ne permette pas d'accéder ni de conserver l'état vitreux et fasse apparaître des cristaux de glace, délétères pour les cellules.

10 Le support non aseptique utilisé jusqu'ici dans les exemples 1 et 2 permet le contact direct de l'échantillon biologique avec l'azote liquide. Il en résulte des vitesses de refroidissement de l'ordre de +/- 20.000°C par minute. A l'inverse, le support aseptique ne permet pas le contact direct de l'échantillon biologique avec l'azote liquide puisque le support portant les embryons est placé dans une paille protectrice. Il résulte de la

15 présence de cette paille que la vitesse de refroidissement est ralentie et n'est plus que de +/- 1000°C par minute.

Pour évaluer l'effet de la vitesse de refroidissement sur la vitrification en une étape selon l'invention, nous avons effectué cette dernière avec les deux types de supports, aseptique et non aseptique. Une seule méthode de réchauffement a été utilisée: en

20 une étape et directement dans du milieu M2.

Comme pour les exemples 1 et 2, des zygotes de souris sont récoltés et directement vitrifiés à ce stade. Un groupe témoin non cryopréservé sert de référence et des groupes contrôle sont vitrifiés par la méthode classique de l'état de la technique décrite par Vanderzwalmen et al. (Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10,

25 2013). D'autres groupes d'embryons sont exposés directement à la VS pendant 50 sec ou 150 sec.

Après cela les embryons sont placés par groupes de cinq (+ ou - 1) sur soit un support non aseptique (VitriPlug®, provenant de Vitrimed®), soit sur un support aseptique

(Vitrisafe®, provenant de Vitrimed®) et plongés directement dans l'azote liquide pour y être conservés pendant une période allant généralement de un jour à une semaine.

- Lors du réchauffement, le groupe contrôle vitrifié selon la méthode classique selon l'état de la technique (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013), est amené brutalement à une vitesse de 20.000°C par minute à la température ambiante en les plongeant dans une solution de saccharose (Sigma S-1888) diluée dans du PBS (Sigma D4031) à la concentration de 0,5M. Ce groupe d'embryons reste dans cette solution pendant une durée variable allant de 1 à 3 minutes avant d'être lavés dans du milieu M2 (milieu de lavage selon Quinn, J.Reprod.Fert. 1982, sept :66(1) :161-8) et d'être ensuite mis en culture dans du milieu M16 ((Whittingham, J.Reprod.Fertil Suppl.1971, 14 : 7-21). Les autres groupes sont également amenés brutalement à une vitesse de 20.000°C par minute à la température ambiante mais en les plongeant directement dans du milieu M2 (Quinn, 1982) avant d'être mis en culture dans du milieu M16 (Whittingham, 1971).
- Le Tableau 3 présente les taux de survie observés 1 heure après le réchauffement et les pourcentages de blastocystes observés au 5^{ème} jour de développement.

Un total de 405 zygotes a été récolté et utilisé au cours de l'exemple 3. Ils ont été récoltés à partir de 17 souris. Du fait de sa plus grande complexité, la vitrification en conditions aseptiques ne peut être réalisée en moins de 50 secondes, c'est pourquoi cette comparaison est réalisée sur cette période de temps dans les deux groupes « aseptique » et « non aseptique ».

Tableau 3 : Taux de survie après 1 heure (T0) et de blastocystes à J5 après vitrification de zygotes en une étape sur supports aseptiques et non aseptiques et réchauffement / réhydratation instantanée dans du milieu M2 sans saccharose

	Nb d'embryons	Nb d'embryons retrouvés (R)	% de survie (S) à T0 (S/R)	% de blastocystes (B) à J5 (B/R)	Nb de répliques
<i>Zygotes</i>					
Contrôle	15	15	100,0 (15)	93,3 (14) ^a	1
Vitrification classique	41	39	87,2 (34)	61,5 (24)	4
VS 50 sec aseptique	57	49	83,7 (41)	73,5 (36) ^c	3
VS 50 sec	52	48	91,7 (44)	58,3 (28)	5

NON-aseptique					
VS 150 sec aseptique	121	110	72,7 (80)	23,6 (26) ^b	3
VS 150 sec NON-aseptique	62	61	75,4 (46)	41,0 (25)	4

Les valeurs avec des exposants différents sont significativement différentes : a:b = $p < 0,02$; b:c = $p < 0,02$.

- Aucune différence significative n'est observée entre les groupes non aseptique et aseptique. Lors d'exposition courte (50 sec) à la VS, les deux types de conteneurs donnent des résultats très semblables et comparables à la vitrification selon l'état de la technique. Pour les deux conditionnements, les expositions plus longues (150 secondes) ont tendance à diminuer le développement en blastocyste, et de manière plus nette pour le support aseptique.
- Cet exemple montre encore que lors de la vitrification selon l'invention, ce n'est pas la présence intracellulaire de CPs qui est liée à la vitrification intracellulaire. En effet, les durées d'exposition les plus courtes à la VS (50 secondes) entraînent la déshydratation de la cellule sans permettre l'entrée de CPs ni d'eau (Vanderzwalmen et al, 2013), ce qui s'est traduit dans les exemples précédents (1 et 2) par une efficacité supérieure (survie et développement) par rapport aux expositions les plus longues qui permettent l'entrée de CPs et d'eau (Vanderzwalmen et al., 2013).
- Il est communément admis lors de la vitrification selon l'état de la technique, que la réduction de la vitesse de refroidissement (par exemple liée à l'utilisation de supports aseptiques) va de pair avec la nécessité d'une concentration intracellulaire en cryoprotecteurs (ICCP) plus élevée. Selon ce principe, vu les ICCPs faibles ou nulles induites par la vitrification selon l'invention, on devrait observer une diminution de la survie des embryons avec les supports aseptiques (qui diminuent considérablement la vitesse de refroidissement). Or, dans les conditions de l'invention où l'ICCP est virtuellement nulle (exposition de 50 secondes), nos résultats ne montrent pas cette diminution de la survie avec les supports aseptiques.

En conclusion, au cours de la vitrification selon l'invention, et lors d'expositions courtes (30 à 50 secondes) à la VS, l'état de déshydratation atteint par les cellules est tel que la

vitesse de refroidissement est moins importante pour atteindre et maintenir l'état vitreux qu'au cours de la vitrification selon l'état de la technique. En cas d'exposition plus longue à la VS (150 secondes) permettant l'entrée de CPs et d'eau dans la cellule après le processus initial de déshydratation (Vanderzwalmen *et al*, Human

- 5 Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013), la relation entre l'ICCP et la vitesse de refroidissement pour atteindre l'état vitreux se rétablit, comme suggéré par l'efficacité qui tend à diminuer lorsque le support aseptique est utilisé.

Exemple 4 : Utilisation du transfert de zygotes dans des souris
 receveuses pseudogestantes pour confirmer la compétence des
 10 embryons à devenir des souriceaux après la vitrification en une
 étape selon l'invention

**Exemple 4a : Vitrification non aseptique: effets de la durée
 d'exposition à la VS sur le % de naissances après transferts**

- 15 La naissance de jeunes après transferts d'embryons vitrifiés en une étape est la preuve ultime de l'absence de toxicité de la méthode.

- (i) Dans ce cadre, des zygotes récoltés et vitrifiés à ce stade après exposition à la VS pendant 30 et 150 secondes ont été transférés dans l'oviducte de souris receveuses pseudogestantes selon le protocole décrit dans « *Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual* » 4th Edition, 2013 Behringer et al, CSHL Press.
 20

Le Tableau 4 présente les pourcentages de naissances obtenus. Des groupes de 154 et 103 zygotes ont été vitrifiés selon le protocole de vitrification non aseptique en une étape et des expositions à la VS de respectivement 30 et 150 secondes ; après réchauffement dans du saccharose 0,25M, 142 et 53 d'entre eux ont été transférés le
 25 même jour dans des souris receveuses pseudogestantes.

Tableau 4 : Pourcentages de jeunes après transferts de zygotes vitrifiés selon le protocole de vitrification non aseptique en une étape et des expositions à la VS de

respectivement 30 et 150 secondes ; le réchauffement a été effectué dans du saccharose 0,25M.

	Nb d'embryons transférés	Nb de receveuses	% de naissances (n)	Nb moyen de jeunes par receveuse	Nb de répliques
<i>Zygotes</i>					
VS 30 sec NON aseptique	142	5	21,8 (31)	5,2	3
VS 150 sec NON aseptique	53	2	22,6 (12)	6,0	2

Aucune différence significative dans le taux de naissance n'a pu être détectée entre les deux durées d'exposition à la VS, ce qui n'est pas étonnant compte tenu de la complexité de l'ensemble du processus et de l'efficacité aléatoire des transferts. Néanmoins, les pourcentages de naissances sont tout à fait comparables à ceux obtenus en routine dans des conditions similaires lors de réimplantations d'embryons vitrifiés selon l'état de la technique (20,9% ; 138 nés/658 transférés ; F. Ectors, données non montrées). La vitrification selon l'invention conserve donc les propriétés biologiques des cellules et est tout à fait compatible avec le développement normal jusqu'à la naissance.

Exemple 4b : Pourcentages de naissances après transferts de zygotes ayant subi la vitrification aseptique en une étape (exposition à la VS de 50 sec) et la réhydratation instantanée en M2.

Le Tableau 5 présente les pourcentages de naissances obtenus. Un groupe de 52 zygotes a été vitrifié selon le protocole de vitrification aseptique en une étape avec exposition à la VS de 50 secondes; le réchauffement a été effectué directement dans du M2 (milieu de lavage selon Quinn, J.Reprod.Fert. 1982, sept :66(1) :161-8). Tous les embryons ont été transférés le même jour dans 2 receveuses pseudogestantes.

Tableau 5: Pourcentages de jeunes après transferts de zygotes vitrifiés selon le protocole de vitrification aseptique en une étape et des expositions à la VS de 50 secondes ; le réchauffement a été effectué directement dans du M2, induisant une réhydratation instantanée.

	Nb d'embryons transférés	Nb de receveuses	% de naissances (n)	Nb moyen de jeunes par receveuse	Nb de répliques
<i>Zygotes</i>					
VS 50 sec aseptique	52	2	34,6 (18)	9,0	1

5

Les pourcentages de naissances sont ici aussi comparables à ceux obtenus en routine (20,9% ; F.Ectors, données non montrées) lors de réimplantations d'embryons vitrifiés selon l'état de la technique.

10 Conjointement, les exemples 4a et 4b (Tableaux 4 et 5) confirment que la vitrification en une étape selon l'invention suivie ou non d'un réchauffement direct en milieu M2 (milieu de lavage selon Quinn, J.Reprod.Fert. 1982, sept :66(1) :161-8), en conditions aseptiques ou non, n'altère pas la compétence des zygotes à assurer une gestation normale après transferts dans une receveuse.

15 **Exemple 5 : Vitrification et réchauffement en une étape selon l'invention de cellules souches embryonnaires murines (mESCs)**

Des expériences préliminaires de vitrification en une étape selon l'invention ont été effectuées sur des mESCs. Les conditions n'ont pas été réunies pour permettre une quantification fiable des taux de survie cellulaires, mais il apparaît qu'elles sont comparables à celles obtenues lors d'une vitrification classique selon l'état de la technique. En outre, des mESCs (R1 de Nagy, lignée 129SV couleur agouti) vitrifiées en une étape selon l'invention ont été microinjectées dans le blastocoele de blastocystes de souris C57BL/6j et ont donné sur les 9 souriceaux nés un pourcentage extrêmement élevé de chimérisme (proche ou égal à 100% !), le pelage des chimères montrant une couleur agouti homogène sur l'entièreté de leur surface corporelle (figure 1).

20

25

La transmission germinale des cellules issues de la lignée vitrifiée a été confirmée par croisement. Il apparaît ainsi que malgré le caractère préliminaire de cette expérience, des cellules à la biologie extrêmement complexe ne voient pas cette dernière altérée
5 par la vitrification en une étape selon l'invention.

Discussion et Conclusions

Au cours du développement embryonnaire préimplantatoire, plus un embryon se
10 divise, plus ses cellules sont petites, et plus son rapport surface/volume est élevé, ce qui permet des échanges transmembranaires plus rapides. De plus, la perméabilité membranaire augmente du fait de l'apparition de nouvelles aquaporines. Remarquons que les cellules présentes au stade morula (+/-16 cellules) ont un rapport surface/volume et des propriétés biologiques générales (physiologie) tout à fait
15 comparable à la plupart des autres cellules de mammifères. Lors de l'exposition en une étape des blastomères à la solution de vitrification (VS) selon l'invention, une plus petite cellule atteint plus rapidement son niveau de déshydratation maximal. Ensuite, les cryoprotecteurs (CPs) pénétrants présents dans les solutions cryoprotectrices peuvent entrer, suivis par l'eau. Le Tableau 1 montre une diminution du
20 développement à J5 pour des expositions à la VS de 150 et 180 sec, plus particulièrement pour les stades plus avancés avec des cellules plus petites (morulas). Si les cellules survivent à la vitrification selon l'invention après une exposition courte à la VS, alors qu'il y a encore très peu (voire pas du tout) de CPs dans son cytoplasme (voir Tableaux 1 et 3), cela confirme que leur survie (et donc la qualité de la
25 vitrification) n'est pas ou est peu conditionnée par l'entrée de CPs. Nos résultats, montrant la grande efficacité d'une exposition courte à la VS, suggèrent qu'une absence de cristallisation prévaut dans ces conditions de vitrification selon l'invention. L'état vitrifié y est très probablement obtenu et maintenu tant au cours du refroidissement que du réchauffement, et ceci malgré une ICCP faible ou nulle. Après

- 30 secondes d'exposition à la VS, la concentration intracellulaire en cryoprotecteurs (ICCP) ne peut en effet qu'être très faible voire nulle. En effet, les durées d'exposition les plus courtes à la VS (30 secondes) entraînent la déshydratation de la cellule sans permettre l'entrée de CPs ni d'eau, ce qui s'est traduit dans cet exemple par une
- 5 efficacité supérieure de la vitrification (survie et développement) par rapport aux expositions les plus longues qui permettent l'entrée de CPs suivis d'eau (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013). Cette très faible pénétration transmembranaire des CPs est encore diminuée par le pré-refroidissement à 4°C de la VS avant l'exposition des embryons.
- 10 Au cours de l'exemple 2 (vitrification en une étape et réchauffement direct en M2 entraînant une réhydratation instantanée; Tableau 2), nous avons renforcé l'hypothèse de la (quasi-)absence de CPs intracellulaires au regard des bons taux de survie observés malgré un réchauffement direct dans une solution normotonique (le milieu M2- milieu de lavage selon Quinn, J.Reprod.Fert. 1982, sept :66(1) :161-8 - sans saccharose). Il
- 15 apparaît en effet que l'activité osmotique additionnelle du saccharose lors du réchauffement après vitrification en une étape selon l'invention n'est pas nécessaire, en particulier pour les expositions courtes à la VS (30 sec). L'immersion brutale des cellules dans une solution normotonique (M2, milieu de lavage selon Quinn, J.Reprod.Fert. 1982, sept :66(1) :161-8) n'entraîne donc pas de mortalité cellulaire
- 20 suite à leur gonflement d'origine osmotique, qui n'entraîne donc pas une augmentation anormale de leur volume. Ce n'est pas le cas lors de la méthode selon l'état de la technique, où un réchauffement direct dans du milieu M2 sans saccharose diminue drastiquement la viabilité de l'embryon, suite à son gonflement trop
- 25 important (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013).

Notre hypothèse selon laquelle, contrairement à la vitrification suivant l'état de la technique, la vitrification en une étape selon l'invention limite drastiquement voire annule l'entrée de CPs dans les cellules se trouve ainsi vérifiée.

- Par ailleurs, en conjonction avec l'expérience 1, cette expérience 2 montre que le
- 30 processus de vitrification en une étape/réchauffement en une étape selon l'invention

est au moins aussi efficace que la vitrification selon l'état de la technique en ce qui concerne la viabilité et le développement des cellules, tout en assurant une réduction voire une annulation de leur contenu en CPs potentiellement délétères à court, moyen ou long terme.

5 L'exemple 3, où des supports aseptiques et non aseptiques sont utilisés permet d'évaluer l'effet de la vitesse de refroidissement au cours de la vitrification selon l'invention. Les résultats obtenus sont inattendus en ceci qu'ils ne correspondent pas à ce qui est observé lors de vitrification selon l'état de la technique, où la vitesse de refroidissement est critique pour éviter la cristallisation. Il est en effet communément
10 admis lors de la vitrification selon l'état de la technique, que la réduction de la vitesse de refroidissement (par exemple liée à l'utilisation de supports aseptiques) va de pair avec la nécessité d'une ICCP plus élevée. Dans l'exemple 3 par contre, aucune différence significative n'est observée entre les groupes non aseptique et aseptique, qui permettent des vitesses de refroidissement très différentes (+/-20.000 °C par
15 minute pour le support non aseptique vs +/- 1000°C par minute pour l'aseptique). En effet, lors d'expositions courtes (50 sec) à la VS, les deux types de conteneurs donnent des résultats très semblables et comparables à la vitrification selon l'état de la technique. Pour les deux conditionnements, les expositions plus longues (150 secondes) ont tendance à diminuer le développement en blastocyste, mais de manière
20 plus nette pour le support aseptique. Selon les principes communément admis, vu les concentrations intracellulaires en cryoprotecteurs (ICCPs) faibles ou nulles induites par la vitrification selon l'invention, on devrait observer une diminution de la survie des embryons avec les supports aseptiques (qui diminuent considérablement la vitesse de refroidissement). Or, dans les conditions de l'invention où l'ICCP est virtuellement nulle
25 (exposition de 50 secondes), nos résultats ne montrent pas cette diminution de la survie avec les supports aseptiques. Ce troisième exemple fait apparaître qu'au cours de la vitrification selon l'invention, et lors d'expositions courtes (30 à 50 secondes) à la VS, l'état de déshydratation atteint par les cellules est tel que la vitesse de refroidissement est moins importante pour atteindre et maintenir l'état vitreux qu'au
30 cours de la vitrification selon l'état de la technique. En cas d'exposition plus longue à la VS (150 secondes) permettant l'entrée de CPs suivis d'eau dans la cellule après le

processus initial de déshydratation (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013), la relation entre l'ICCP et la vitesse de refroidissement pour atteindre l'état vitreux se rétablit, comme suggéré par l'efficacité qui tend à diminuer lorsque le support aseptique est utilisé.

- 5 Nos conclusions concernant l'efficacité et l'innocuité d'une vitrification selon l'invention avec exposition courte à la VS avant refroidissement et dilution directe en milieu de lavage M2 sont encore renforcées par les taux de naissances obtenus après transferts (Tableaux 4 et 5). Les pourcentages moyens de souriceaux obtenus en routine après transferts de zygotes non cryopréservés et vitrifiés selon l'état de la
- 10 technique sont respectivement de 20,2 % et 20,9% (F. Ectors, résultats non montrés). Conjointement, les exemples 4a et 4b montrent des efficacités comparables de la vitrification selon l'invention qui n'altère pas la compétence des zygotes à assurer une gestation normale après transferts dans une receveuse.

Ceci démontre que tant la déshydratation que la réhydratation instantanées précédant

15 et suivant respectivement le refroidissement et le réchauffement lors d'une vitrification en une étape selon l'invention ne sont pas délétères aux différents stades de développement.

A la vue de nos résultats obtenus *in vitro* mais également après transferts d'embryons , nous pensons pouvoir affirmer qu'après exposition des embryons pendant 30 sec à la

20 VS, c'est-à-dire au moment correspondant à la déshydratation cellulaire maximale (Vanderzwalmen *et al*, Human Reproduction, vol 28, 2101-2110, p 1-10, 2013), la vitrification (et donc la viabilité) n'est pas liée à la présence de CPs dans la cellule mais bien due à l'absence d'eau osmotiquement active, encore appelée eau libre ou

vicinale.

- 25 Ainsi, la déshydratation cellulaire liée à l'exposition à la VS pendant une durée aussi courte que 30 secondes à 4°C ne permet pas l'entrée de CPs, mais est suffisante pour déshydrater la cellule et l'amener à des conditions compatibles avec sa survie lors des différentes étapes de la vitrification. Il semble que la présence de protéines, de sels, de macromolécules, d'organites et de polysaccharides au sein de la cellule permette,
- 30 lorsque celle-ci est suffisamment déshydratée, de former un état solide vitreux lors du

refroidissement par augmentation à l'infini de la viscosité intracellulaire. Il y aurait donc deux types d'états vitreux impliqués dans nos expériences : (i) un état vitreux intracellulaire lié à l'absence d'eau vicinale associée à la transformation du gel cytoplasmique en un solide vitreux lors du refroidissement, et (ii) un état vitreux du milieu extracellulaire moins concentré en macromolécules et polysaccharides et où la solidification amorphe de l'eau exige la présence de CPs à concentrations élevées. Cela démontre que pour autant que les conditions d'une vitrification extracellulaire soient respectées, et que la déshydratation cellulaire soit suffisante, la présence de CPs intracellulaires n'est pas indispensable à la survie cellulaire au cours de l'ensemble du processus de vitrification.

Les exemples et validations de la vitrification selon l'invention ont été effectués sur des embryons au stade zygote et au stade morula. Rappelons que les cellules présentes au stade morula (+/-16 cellules) ont un rapport surface/volume et des propriétés biologiques générales (physiologie) tout à fait comparable à la plupart des autres cellules de mammifères, ce qui permet l'extrapolation des résultats à ces autres types de cellules. Par ailleurs, des expériences sur ces cellules (mESCs R1) confirment que la vitrification en une étape selon l'invention est efficace sur d'autres cellules sans en altérer la biologie.

En conclusion, la vitrification selon l'invention repose sur une approche inédite faisant intervenir une déshydratation cellulaire éliminant l'eau libre sans pénétration de CPs. Outre une simplification méthodologique sans altération de l'efficacité par rapport au protocole classique selon l'état de la technique, elle présente l'avantage d'éliminer les effets toxiques, y compris génotoxiques, connus ou inconnus, à court, moyen ou long terme, liés aux expositions prolongées du milieu intracellulaire aux CPs.

Revendications

1. Méthode de cryopréservation de matériel biologique comprenant une étape unique
5 d'exposition à une solution vitrifiante hyperosmotique enrichie d'au moins un agent cryoprotecteur, pendant une durée inférieure à 90 sec et préalablement au refroidissement à une température de cryopréservation du matériel biologique .
2. Méthode selon la revendication 1 comprenant en outre une étape de vitrification du matériel biologique sur support, par immersion dans un milieu de refroidissement.
- 10 3. Méthode selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que le matériel biologique est un embryon.
4. Méthode selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que le matériel biologique comprend des cellules embryonnaires ou autres cellules apparentées ou dérivées.
5. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que la
15 solution hyperosmotique vitrifiante comprend un dérivé polysaccharide en présence de saccharose.
6. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que l'agent cryoprotecteur est un mélange de diméthylsulfoxyde (DMSO) et d'éthylène glycol
- 20 7. Méthode selon la revendication 6 caractérisée en ce que le ratio DMSO/Ethylène glycol est 50:50.
8. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que la solution vitrifiante comprend également du sérum animal ou humain comme agent cryoprotecteur.
- 25 9. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 comprenant plus particulièrement les étapes suivantes :

a) mise en contact du matériel biologique avec une solution vitrifiante hyper osmotique pendant une durée inférieure à 90 sec ;

b) dépôt du matériel biologique issu de l'étape a) sur un support ;

c) vitrification du matériel biologique déposé sur support dans le milieu de

5 refroidissement.

10. Méthode selon la revendication 9 caractérisé en ce que matériel biologique déposé sur support est introduit dans une paillette scellée à une extrémité avant d'être plongé dans le milieu de refroidissement.

10 11. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisée en ce que le milieu de refroidissement est l'azote liquide.

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 caractérisée en ce que la solution vitrifiante est préalablement refroidie à une température entre 5 et 1°C, de préférence 4°C avant d'être mise en contact avec le matériel biologique.

15 13. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 comprenant également une étape unique de réchauffement brutal dans une solution normotonique à la température ambiante, du matériau biologique issu de la vitrification.

14. Méthode selon la revendication 13 caractérisée en ce que le réchauffement brutal se fait à une vitesse à 20.000°C par minute.



5 Figure 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/083123

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01N1/02
ADD.
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)
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 practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	E.M.M. ABDEL-GAWA ET AL: "Effect of Cryoprotective Solutions, Ethylene Glycol, Dimethyle-sulfoxide and Ficoll 70 with Different Combination Ratios on Vitrification of Bovine Oocytes and Embryos Produced in vitro", ASIAN JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY ADVANCES, vol. 11, no. 10, 1 October 2016 (2016-10-01), pages 608-619, XP055349195, ISSN: 1683-9919, DOI: 10.3923/ajava.2016.608.619 Discussion; page 609 - page 611 ----- -/--	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family 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 application or patent 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 19 March 2018	Date of mailing of the international search report 27/03/2018
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Butkowskyj-Walkiw, T
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/083123

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/096659 A1 (COOK GENERAL BIOTECHNOLOGY LLC [US]; HAN XU [US]) 27 June 2013 (2013-06-27) page 3 - page 4; claims; examples 1,3-5; tables 1,4,6,7	1-14
A	----- EP 1 326 492 B1 (ORGAN RECOVERY SYSTEMS INC [US]) 12 May 2004 (2004-05-12) paragraphs [0033] - [0036]; claims; examples -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2017/083123

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013096659	A1	27-06-2013	NONE

EP 1326492	B1	12-05-2004	AU 1179202 A 29-04-2002
		AU 2002211792	B2 27-07-2006
		CA 2426169	A1 25-04-2002
		DE 60103297	D1 17-06-2004
		DE 60103297	T2 02-06-2005
		EP 1326492	A2 16-07-2003
		JP 2004511497	A 15-04-2004
		WO 0232225	A2 25-04-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/083123

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A01N1/02 ADD.		
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) 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) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	E.M.M. ABDEL-GAWA ET AL: "Effect of Cryoprotective Solutions, Ethylene Glycol, Dimethyle-sulfoxide and Ficoll 70 with Different Combination Ratios on Vitrification of Bovine Oocytes and Embryos Produced in vitro", ASIAN JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY ADVANCES, vol. 11, no. 10, 1 octobre 2016 (2016-10-01), pages 608-619, XP055349195, ISSN: 1683-9919, DOI: 10.3923/ajava.2016.608.619 Discussion; page 609 - page 611 ----- -/--	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 19 mars 2018		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27/03/2018
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, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Butkowskyj-Walkiw, T

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	<p>WO 2013/096659 A1 (COOK GENERAL BIOTECHNOLOGY LLC [US]; HAN XU [US]) 27 juin 2013 (2013-06-27) page 3 - page 4; revendications; exemples 1,3-5; tableaux 1,4,6,7</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14
A	<p>EP 1 326 492 B1 (ORGAN RECOVERY SYSTEMS INC [US]) 12 mai 2004 (2004-05-12) alinéas [0033] - [0036]; revendications; exemples</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/083123

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013096659	A1	27-06-2013	AUCUN

EP 1326492	B1	12-05-2004	AU 1179202 A 29-04-2002
		AU 2002211792 B2	27-07-2006
		CA 2426169 A1	25-04-2002
		DE 60103297 D1	17-06-2004
		DE 60103297 T2	02-06-2005
		EP 1326492 A2	16-07-2003
		JP 2004511497 A	15-04-2004
		WO 0232225 A2	25-04-2002
