

" Le pessimisme est d'humeur  
d'optimisme et de volonte "

Ann. Méd. Vét., 1978, 122, 515-526

A. Lain.  
le 21/11/1978

Article original

## Congélation d'embryons suivie de transfert chez les bovins : première utilisation des paillettes<sup>(1)</sup>

A. MASSIP, B. JACQUELOT, F. ECTORS, R. DE COSTER,  
G. D'IETEREN \*, C. HANZEN, J. DERIVAUX

Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Chaire d'Obstétrique,

\* Chaire de Chirurgie,  
Rue des Vétérinaires 45,  
B - 1070 Bruxelles.

### RESUME

62 embryons de bovins récoltés entre les jours 7 et 8 du cycle ont été congelés par la méthode rapide de Willadsen et al. (1978a).

13 morulas retardées ont été cultivées jusqu'au stade de blastocyste avant d'être congelées. Aucun des blastocystes ainsi obtenus n'a survécu après décongélation.

49 embryons (34 jeunes blastocystes ou blastocystes et 15 morulas avancées) ont été congelés aussitôt après la récolte : 38 en ampoules de pyrex, 11 en minipaillettes Cassou.

Le taux de survie globale est de 53,2 % ; 45 % des embryons transplantés se sont développés en fœtus ce qui représente 18,4 % de l'ensemble des embryons congelés. 7 receveuses sur 19 (36,8 %) sont gestantes (diagnostic effectué par dosage de la progesté- rone à 21 jours et confirmé par fouiller rectal à 60 jours).

La congélation des embryons en minipaillettes donne des résultats encourageants.

(1) Travail réalisé sous les auspices de l'I.R.  
S.I.A., rue de Crayer, 6, 1050, Bruxelles.  
Manuscrit déposé le 19 juillet 1978.

## INTRODUCTION

Depuis la naissance, en 1973, du premier veau issu du transfert d'un embryon congelé (Wilmot et Rowson, 1973), les techniques de congélation se sont développées dans différents pays sur la base des travaux effectués à Cambridge successivement par Wilmot et Willadsen. Les résultats, variables d'un pays à l'autre, s'améliorent au fil des années (tableau 1). Nous rapportons ci-après les premiers résultats de congélation et transfert obtenus en Belgique.

## MATERIEL ET METHODES

Les donneuses et receveuses utilisées sont des génisses de diverses races (Frisonne, Blanc-Bleu Belge), âgées d'environ 2 ans et pesant en moyenne 400 kg.

### A) Superovulation

La technique de superovulation employée est celle préconisée par Trounson et *al.* (1976b) à savoir :

- a) injection intramusculaire de 2 000 UI de PMSG (Folligon Intervet) entre le 9<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour du cycle (Jour 0 = jour de l'œstrus),
- b) 48 heures plus tard, injection intramusculaire de PGF2 $\alpha$  synthétique (1 mg d'Estrumate I.C.I.),
- c) inséminations répétées par sperme congelé 2 à 3 fois à 12 heures d'intervalle lors des chaleurs qui surviennent généralement 48 heures après l'injection de prostaglandines.

Les embryons sont récoltés entre les jours 7 et 8 du cycle par la méthode chirurgicale de Rowson et *al.* (1969), et en utilisant le milieu PBS de Wittingham (1971).

Au moment de la récolte les œufs fécondés se trouvent à divers stades de développement : les uns sont encore au stade de morula, les autres ont atteint le stade blastocyttaire.

L'expérimentation fut poursuivie suivant deux modalités :

### Expérience 1 :

- a) les embryons au stade blastocyttaire sont soumis directement à la congélation ;
- b) les embryons au stade morula sont placés en culture dans le milieu B<sub>2</sub> (Ménezo, 1976), à 37 °C, sous atmosphère gazeuse. Le stade de blastocyste atteint, ces embryons sont congelés.

### Expérience 2 :

congélation directe des embryons quel que soit leur stade de développement (morula ou blastocyste).

## B) Technique de congélation

(Willadsen et *al.* 1978a, expérience B)

1. passage des embryons, à température ambiante, dans 3 bains successifs de PBS additionné de DMSO aux concentrations suivantes : 0,5M, 1M, 1,5M. Le séjour dans chacun de ces bains est de 10 minutes pour les 2 premiers et de 30 à 40 minutes pour le troisième.
2. les embryons sont ensuite répartis, à raison de 2, soit en ampoules de pyrex (0,5 × 5 cm) ainsi que le font Willadsen et *al.* (1978a), ou en minipaillettes de Cassou (technique personnelle). Ampoules et paillettes renferment 0,25 ml du milieu PBS + DMSO à la concentration de 1,5M. Les ampoules sont scellées à la flamme tandis que les paillettes sont obturées avec de la poudre d'alcool polyvinylique.
3. après répartition, refroidissement de la température ambiante jusqu'à - 6, - 7 °C à raison de 1 °C/min dans un appareil à congélation programmée (Air Liquide). L'induction de la cristallisation entre - 6 et - 7 °C est obtenue par refroidissement local de la paroi de l'ampoule ou de la paillette à l'aide d'une pince préalablement plongée dans l'azote liquide.
4. le refroidissement est ensuite poursuivi à raison de 0,3 °C/min de - 7 °C à - 30 °C, puis de 0,1 °C/min de - 30 °C à - 33 °C, après quoi ampoules et paillettes sont directement plongées dans l'azote liquide.

TABLEAU 1. — Résultats des essais de congélation et transfert chirurgical d'embryons de bovins publiés jusqu'à présent.

Pays	Auteurs	Agent cryoprotecteur	Nombre d'embryons				Nombre de receveuses gestantes/Nombre de receveuses (%)
			Congelés	Considérés comme normaux après décongélation (%)	Transplantés	Développés en fœtus ou veaux vivants (%)	
Angleterre	Wilmut et Rowson 1973	2,0 M DMSO	33	31(94)	21	1(4,8) <sup>*</sup> (3)**	1/11(9,1)
			61	35(57,4)	32	11(34,4) (18)	9/19(47,4)
	Willadsen et al 1977	1,5 M DMSO	39	26(66,7)	23	13(56,5) (33,3)	8/11(72,7)
			10	10(100)	9	6(66,7) (60)	6/ 9(66,7)
Australie	Willadsen, Polge et Rowson 1978	1,5 M DMSO	42	38(90,5)	36	11(30,6) (26,2)	10/25(40)
			Bilton et Moore 1977	1,5 M DMSO	15	—	8
Canada	Shea, Ollis et Jacobson 1977	1,0 M glycérol			9	—	8
			Danemark	Lehn-Jensen et Greve 1978	1,5 M DMSO	16	—
36	28(77,8)	17				7(41,2) (19,4)	

\* % calculé par rapport au nombre d'embryons transplantés

\*\* % calculé par rapport au nombre d'embryons congelés

5. la durée de stockage a varié entre 1 et 49 jours. Une fois retirées de l'azote, ampoules ou paillettes sont réchauffées brusquement en les plongeant dans l'eau à 25 °C.
6. les embryons sont ensuite transférés dans du PBS additionné de DMSO à la concentration 1,5M, extemporanément préparé, puis passés successivement, à raison chaque fois de 10 minutes, dans des bains de concentration décroissante en DMSO (1,5M, 1,25M, 1M, 0,75M, 0,5M, 0,25M et finalement dans le PBS pur).

Une fois dans le PBS, ils sont examinés au microscope (100 ×) pour apprécier leur aspect morphologique.

Ceux qui ont conservé une morphologie normale sont utilisés immédiatement pour le transfert; les autres, quel que soit leur aspect, sont mis en culture à 37 °C soit dans du PBS additionné de 20 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, soit dans le milieu B<sub>2</sub> (Ménezo 1976) en appliquant la méthode de la cellule étanche (Mulnard 1965), sous atmosphère gazeuse (N<sub>2</sub>: 90 % - CO<sub>2</sub>: 5 % - O<sub>2</sub>: 5 %) et transplantés s'ils reprennent un aspect normal.

La transplantation s'opère suivant la méthode chirurgicale décrite par Rowson *et al.* (1969); ils sont déposés dans la corne ipsilatérale au corps jaune à quelques 5-6 cm de la jonction utéro-tubaire. Les receveuses se trouvent, à 1/2 jour près, au même stade du cycle qu'était la donneuse.

## RESULTATS

### Expérience 1 : Embryons au stade morula cultivés jusqu'au stade de blastocyste avant congélation

13 embryons récoltés au stade de morula ont atteint le stade de blastocyste après 20 à 24 heures de culture et furent ensuite congelés. Aucun d'eux ne survivait après décongélation.

### Expérience 2 : Congélation directe

49 embryons, dont 34 au stade de jeune blastocyste ou de blastocyste et 15 au stade de morula avancée, ont été congelés immédiatement après la récolte suivant la technique décrite; 47 ont été récupérés après décongélation. Les taux de survie et de développement après décongélation et transfert figurent dans le tableau 2.

De ces 47, un a été perdu au cours des manipulations, 18 ont été considérés comme normaux et immédiatement utilisés tandis que les 28 autres ont été mis en culture. De ces 28 embryons, 7 seulement se sont développés, les autres ont dégénéré. La figure 3 montre un jeune blastocyste transplanté avec succès après 5 heures de culture dans du milieu PBS + 20 % de sérum fœtal de veau. Les critères d'appréciation de normalité et de viabilité ont été les suivants :

- a) pour les blastocystes : retour à l'aspect morphologique existant avant la congélation (fig. 1) et mise en évidence d'un bouton embryonnaire bien distinct. Il est intéressant de signaler que la congélation contracte le blastocyste (fig. 2) et que l'aspect normal ne réapparaît qu'après passage dans les divers bains successifs de DMSO et dans le PBS.
- b) pour les morulas, le critère de normalité réside dans la présence d'une masse cellulaire homogène et compacte avec blastomères au contour net et précis et le critère de viabilité dans la formation d'une cavité blastocoelique.

Il arrive que la zone pellucide soit fendue ou absente, cette anomalie n'altère pas le développement ultérieur. Dans

TABLEAU 2. — Résultats de nos essais de congélation et transfert.

	Nombre d'embryons					Nombre de receveuses		
	Congelés	Récupérés (%)	Considérés comme normaux après décongélation (%)	Mis en culture	Développés en culture (%)	Transplantés	Développés en fœtus (%)	gestantes/Nombre de receveuses (%)
Ampoules de verre	38	36	14(38,9)	22	5(22,7)	15	7(46,7)* (18,4)**	5/14(35,7)
Paillettes	11	11	4(36,4)	6	2(33,3)	5	2(40) (18,2)	2/ 5(40)
Total	49	47(96)	18(38,3)	28	7(25)	20	9(45) (18,4)	7/19(35,8)

\* % calculé par rapport au nombre d'embryons transplantés

\*\* % calculé par rapport au nombre d'embryons congelés

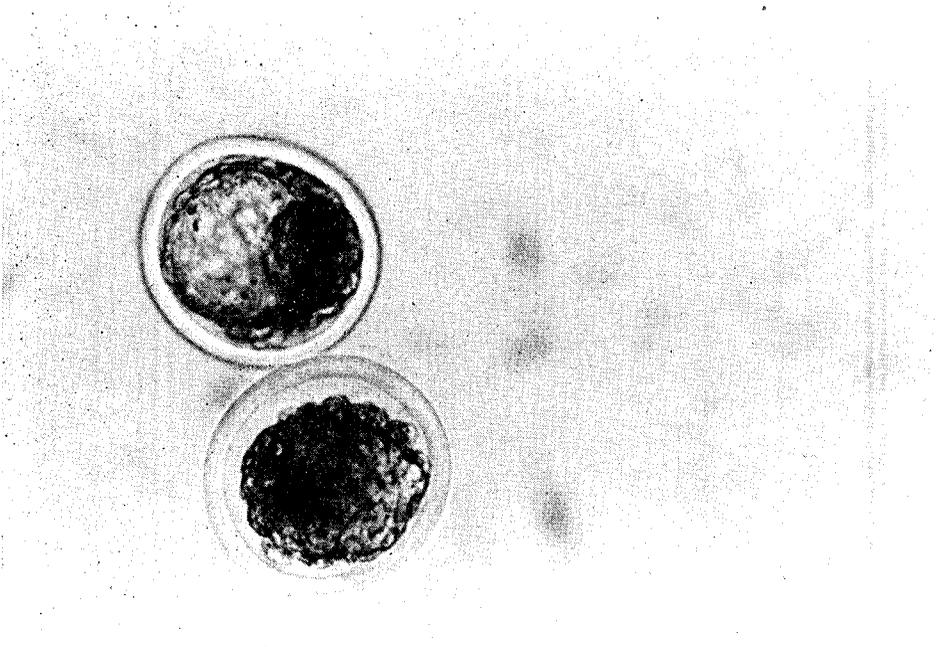


Fig. 1. — 2 jeunes blastocystes avant congélation ( $\times 250$ ).

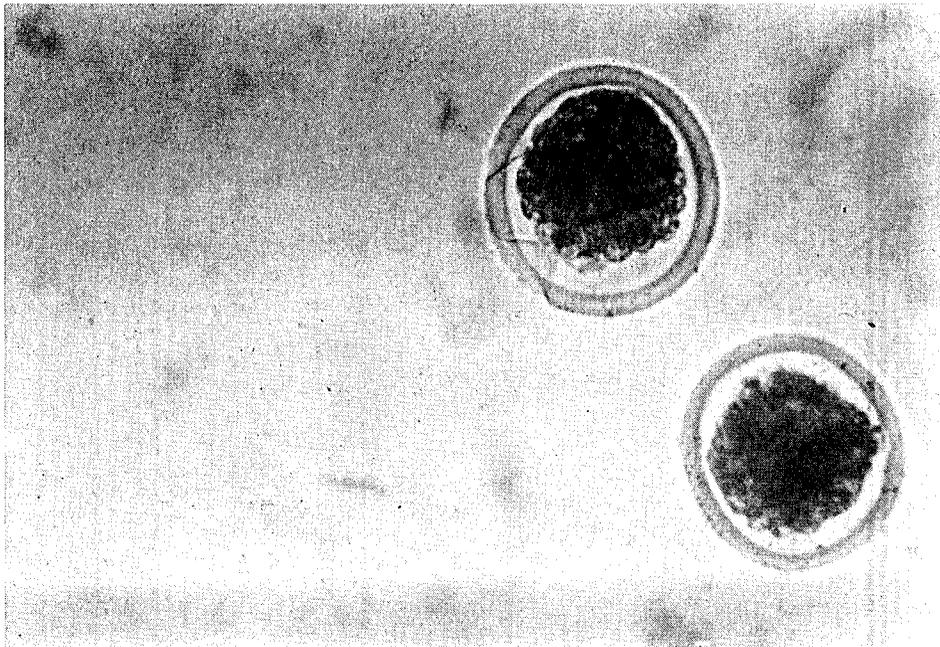


Fig. 2. — Les mêmes blastocystes après décongélation. Celui du dessus a la pellucide fendue et a été mis en culture, celui du dessous a été transplanté directement.

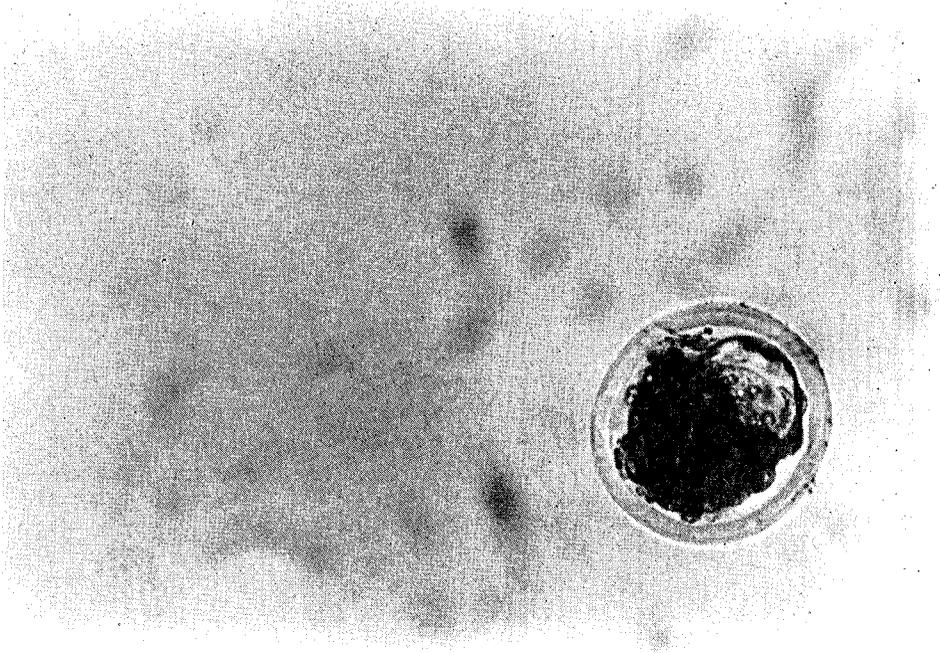


Fig. 3. — Blastocyste de la figure 2 avec pellucide cassée, après 5 h de culture dans du PBS + 20 % de sérum de veau fœtal décomplémenté.

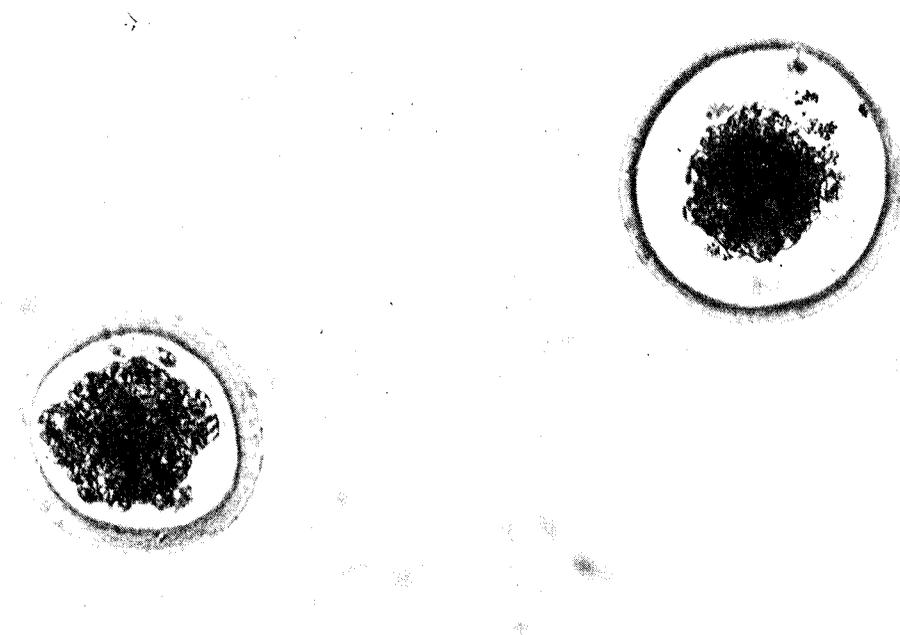


Fig.4. — 2 blastocystes dégénérés après décongélation.

notre cas, 25,5 % des embryons présentent cette anomalie.

La dégénérescence se traduit par la présence d'un amas cellulaire foncé, rétracté, totalement ou partiellement granuleux, désorganisé et n'occupant que 25 à 30 % de l'espace délimité par la zone pellucide (fig. 4).

Nous devons signaler que la reprise du développement se produit au cours des 12 à 18 premières heures de la mise en culture ; passé ce délai, tous les embryons récupérés étaient dégénérés quel que soit le milieu utilisé.

Ainsi donc des 47 embryons récupérés après décongélation, 18 (38,3 %) étaient directement utilisables et 7 le sont devenus après culture ; le taux de survie globale obtenu est donc de 25 sur 47 soit 53,2 %.

20 de ces embryons ont été transplantés à savoir les 18 considérés d'emblée comme normaux après décongélation et 2 obtenus respectivement après 5 et 24 heures de culture.

19 receveuses ont été utilisées ; chez 18 la transplantation fut simple, la dix-neuvième a reçu 2 embryons. 7 receveuses sur 19 (36,8 %) ont été reconnues gestantes d'abord par la mise en application du test à la progestérone réalisé aux jours 21, 25 et 42 et ensuite par la technique du fouiller rectal à 60 jours. Le retour en chaleurs des non gestantes s'est opéré, pour 7 d'entre elles à la date normale et pour 4 après des délais respectifs de 33, 37, 55 et 58 jours. Il est vraisemblable que ces retours tardifs correspondent soit à un cycle prolongé soit à un état gestatif interrompu par la mortalité embryonnaire ou fœtale.

## DISCUSSION

### Expérience 1

Bien que portant sur un échantillon relativement réduit, les résultats de notre première expérience suggèrent certaines réflexions ou conclusions.

Les blastocystes issus de *morulas cultivées* pendant 24 heures paraissent inaptes à la congélation.

Deux explications pourraient être trouvées à ce phénomène : a) la viabilité intrinsèque plus faible de l'embryon, b) une moindre résistance au refroidissement.

Willadsen et *al.* (1978a) ont déjà signalé que des morulas de 5 jours ou de jeunes blastocystes ne survivent généralement pas à la congélation alors que des morulas plus âgées ou des blastocystes de 6 1/2 à 7 1/2 jours supportent bien la congélation et le réchauffement. La résistance acquise par l'embryon au cours des jours 6 et 7 du développement serait donc particulièrement importante.

Trounson et *al.* (1976a) avaient déjà montré que le comportement de l'embryon *in vitro* est fortement influencé par son stade de développement lors de la récolte ; Renard et *al.* (1978) aboutissent à des conclusions du même ordre après étude portant sur des embryons récoltés au jour 10 et classés par stades de développement. D'après ces derniers, le faible taux de survie après transfert d'embryons cultivés ne relèverait pas d'une moindre viabilité de l'embryon mais d'un asynchronisme entre le stade réel de développement de celui-ci et le stade physiologique de la receveuse au moment du transfert. L'embryon mis en culture ne se développe pas de même manière qu'en milieu naturel. Il a été montré notam-

ment par des numérations cellulaires faites après fixation et coloration des embryons cultivés que, pour un même état de développement, le nombre de cellules est toujours moindre chez les embryons cultivés que chez les embryons frais de même taille. A ces modifications morphologiques sont sans doute associées des modifications physico-chimiques responsables de ce comportement différent au cours de la congélation des embryons cultivés. Par ailleurs la réadaptation au milieu utérin est meilleure pour les embryons frais, prélevés entre le 5<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour et congelés que pour des embryons de même âge soumis à culture. Trounson et *al.* (1976a) obtiennent un taux de survie de 60 % avec des blastocystes de 6 à 7 jours non cultivés contre 38,5 % pour des blastocystes obtenus après culture de morulas de même âge pendant 24 heures, puis refroidis et stockés 48 heures à 0 °C.

## Expérience 2

En 1978, Willadsen et *al.* (1978a) communiquaient les résultats des expérimentations poursuivies *in vitro* à partir de la technique mise au point suite aux travaux de 1977 (Willadsen, 1977) et que nous avons utilisée. Ils signalaient qu'à partir de cette technique le taux de survie embryonnaire, observé après 24 heures de culture dans un mélange de PSB + 20 % de sérum de mouton était de 76,2 %. Ils ajoutaient que la plus grande partie des embryons survivants renfermaient un certain pourcentage de cellules dégénérées sans pouvoir préciser cependant quelle était la proportion tolérable de cellules dégénérées pour que l'embryon puisse garder sa viabilité. Pour eux, la meilleure preuve de survie de l'embryon, à la fin de la période de culture, est la présence du

disque embryonnaire. Willadsen et *al.* (1976) avaient démontré antérieurement qu'il existait, notamment pour les embryons bovins, une très bonne corrélation entre la survie *in vitro* et la viabilité après transfert ce qui, du point de vue pratique, est certainement le plus important. Nous avons donc décidé d'utiliser cette méthode suivant les modalités énoncées à savoir : étude *in vitro* et transfert direct.

### a) Etude *in vitro*

Des 28 morulas ou jeunes blastocystes congelés directement et remis en culture pendant 24 heures, 7 soit 25 % se sont développés. Si nous posons qu'en principe, les 18 embryons considérés d'emblée comme normaux et utilisés comme tels auraient subi un développement identique, cela porterait à 53,2 % le taux de survie globale (25/47). Ce pourcentage reste inférieur à celui obtenu par Willadsen et *al.* (1978a). La raison peut en être recherchée dans les conditions différentes de culture et dans le fait que l'addition de sérum de mouton au milieu PBS paraît préférable à l'addition de sérum fœtal de veau. On peut également invoquer les critères de sélection des embryons avant congélation. Nous avons constaté l'absence de survie après 24 heures de culture ; ce phénomène, comme nous le rappelions précédemment, peut s'expliquer soit par une forte proportion de cellules dégénérées, soit par les conditions mêmes de la culture *in vitro*, bien différentes des conditions de développement en milieu utérin.

### b) Transfert

18 embryons ont été transplantés directement après décongélation et retrait du DMSO ; 2 embryons transplantés provenaient d'une remise en culture de 5 et 24 heures.

De ces 20 transplantations, ayant porté sur 19 bêtes, 7 gestations (36,8 %) sont actuellement confirmées à 60 jours.

Les résultats obtenus par cette méthode de congélation sont inférieurs à ceux obtenus par d'autres auteurs, à partir de méthodes plus élaborées et qui figurent dans le tableau 1. Nous constatons également, comme l'ont signalé Willadsen et *al.* (1978a) que le réchauffement rapide à 25 °C donne un taux de survie appréciable et que dès lors le réchauffement lent et progressif n'a pas l'importance qui lui avait été reconnue précédemment. L'un de nous (Massip : observation non publiée) a par ailleurs observé, en travaillant sur des embryons de souris, que la technique de congélation lente en minipaillettes, suivie d'un réchauffement rapide (température ambiante) est aussi compatible avec la survie embryonnaire.

Nous ajouterons que pour la première fois, du moins à notre connaissance, la congélation a été faite en minipaillettes et qu'elle fut couronnée de succès puisque un état gestatif s'est développé chez 2 des 5 animaux transplantés.

Si l'on examine le tableau 1 on observe que les résultats les plus favorables enregistrés jusqu'ici suite à la transplantation d'embryons ayant subi la congélation sont ceux rapportés par Willadsen et ses collaborateurs. Le fait peut être attribué à la maîtrise particulière que ces auteurs ont acquise de cette technique dont ils sont les pionniers. On pourrait cependant s'étonner que les résultats publiés en 1978 (Willadsen et *al.* 1978b) soient inférieurs à ceux obtenus précédemment. L'explication réside dans le fait que Willadsen a apporté diverses variantes à sa technique pour juger de leur influence sur les conditions de conservation et dès lors du

transfert. Personnellement nous n'avons pas tenu compte de ces variantes dans l'énoncé global des résultats consignés dans le tableau. Ces expériences lui ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- l'élimination du DMSO est indispensable avant le transfert des embryons (de 20 embryons transplantés sans enlever le DMSO, un seul s'est développé).
- le transfert doit s'opérer sans délai dès le retrait du DMSO : sur 11 embryons transplantés dans les 2 heures de l'enlèvement du DMSO, 8 se sont développés contre 2 sur 5 pour un transfert après 12 heures.

Ces expérimentations montrent également que les embryons congelés-décongelés supportent moins bien le stockage que les embryons frais.

Diverses explications peuvent également être trouvées à la variabilité des résultats publiés jusqu'ici sur la transplantation à partir d'embryons bovins ayant subi la congélation :

- les méthodes employées,
- la maîtrise des expérimentateurs sur le plan technique et notamment leur pouvoir d'appréciation de la qualité des embryons,
- l'équipement utilisé,
- la qualité des donneuses et des receveuses. La qualité des embryons varie suivant les donneuses (Trounson et *al.* 1976a).

## CONCLUSION

La mise au point de la conservation des œufs de bovins à basse température marque des progrès limités mais constants. La méthode proposée par Wil-

ladsen et al. (1978aB) et que nous avons appliquée nous paraissait intéressante par sa simplicité, sa rapidité et l'excellent taux de survie enregistré *in vitro*. Cependant nos résultats après transfert ainsi que les essais effectués sur le terrain (Polge et Willadsen : communication personnelle) ne semblent pas répondre à ces espoirs.

Elle nous a permis personnellement de montrer la possibilité de la conservation

en paillettes, ce qui devrait favoriser un recours plus fréquent à la transplantation non chirurgicale.

Il reste toutefois divers problèmes à résoudre notamment celui de la survie limitée des embryons décongelés et remis en culture et celui plus important, parce que fondamental, d'obtenir de manière régulière un nombre suffisant d'œufs de bonne qualité.

## REFERENCES

- BILTON R.J., MOORE N.W. Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fert.*, 1977, **50**, 363.
- LEHN-JENSEN H., GREVE T. Low temperature preservation of cattle blastocysts. *Theriogenology*, 1978, **9**, 313.
- MENEZO Y. Milieu synthétique pour la survie et la maturation des gamètes et pour la culture de l'œuf fécondé. *C.R. Acad. Sci.*, 1976, D **282**, 1967.
- MULNARD J.G. Analyse microcinématographique du développement de l'œuf de souris du stade II au blastocyste. *Arch. Biol.* (Liège), 1967, **78**, 107.
- RENARD J.P., MENEZO Y., SAUMANDE J., HEYMAN Y. Attempts to predict the viability of cattle embryos produced by superovulation. In *Reproduction in the cow* (E.E.C. Symposium, Galway). Ed. J.M. Sreenan. Commission of the European Communities, Luxembourg 1978. Sous presse.
- ROWSON L.E.A., MOOR R.M., LAWSON R.A.S. Fertility following egg transfert in the cow; effect of method, medium and synchronization of œstrus. *J. Reprod. Fert.*, 1969, **18**, 517.
- SHEA B.F., OLLIS G.W., JACOBSON M.E. Pregnancies following long distance transport and transfer of frozen bovine embryos. *Can. J. Anim. Sci.*, 1977, **57**, 801.
- TROUNSON A.O., WILLADSEN S.M., ROWSON L.E.A. The influence of « *in vitro* » culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *J. Reprod. Fert.*, 1976a, **47**, 367.
- TROUNSON A.O., WILLADSEN S.M., ROWSON L.E.A., NEWCOMB R. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. *J. Reprod. Fert.*, 1976b, **46**, 173.
- WHITTINGHAM D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 1971, **233**, 125.
- WILLADSEN S.M., TROUNSON A.O., POLGE C., ROWSON L.E.A., NEWCOMB R. Low temperature preservation of cow eggs. In *Egg transfer in cattle*. (E.E.C. Symposium, Cambridge). Ed. L.E.A. Rowson. Commission of the European Communities, Luxembourg 1976, 117.
- WILLADSEN S.M. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In *The freezing of mammalian embryos*. Elsevier, *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1977, 175.
- WILLADSEN S.M., POLGE C., TROUNSON A.O., ROWSON L.E.A. Transplantation of sheep and cattle embryos after storage at  $-196^{\circ}\text{C}$ . In *The freezing of mammalian embryos*. Elsevier, *Excerpta Medica*, Amsterdam 1977, 190.
- WILLADSEN S.M., POLGE C., ROWSON L.E.A. *In vitro* storage of cattle embryos. In *Reproduction in the cow* (E.E.C. Symposium, Galway). Ed. J.M. Sreenan. Commission of the European Communities, Luxembourg 1978a. Sous presse.
- WILLADSEN S.M., POLGE C., ROWSON L.E.A. The viability of deep-frozen cow embryos. *J. Reprod. Fert.*, 1978b, **52**, 391.
- WILMUT I., ROWSON L.E.A. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 1973, **92**, 686.

## SUMMARY

### **Deep-freezing of cattle embryos in French straws followed by transfer.**

A. Massip, B. Jacquelot, F. Ectors, R. De Coster, G. d'Ieteren, C. Hanzen, J. Derivaux.

Department of Obstetrics and Surgery,  
Rue des Vétérinaires, 45,  
1070, Brussels, Belgium.

62 cattle embryos collected on days 7-8 after the onset of oestrus have been frozen using the « two-step » freezing procedure of Willadsen and *al.* (1978a).

13 were blastocysts obtained after *in vitro* culture of late morulae for 24 hours. None was surviving after thawing.

49 (34 early blastocysts or blastocysts and 15 advanced morulae) were frozen soon after surgical recovery either in glass ampoules or French straws. The overall survival rate was 53,2%. 45% of surgically transferred embryos developed into foetuses, i.e. 18,4% of frozen embryos. The pregnancy rate was 36,8%.

Use of plastic straws appears to be promising for the future.