

Comparaison des résultats de la vitrification et de la congélation lente des embryons au stade clive précoce (j2-j3) : étude rétrospective cas-témoin

Juliette Uranga-Chauvel

▶ **To cite this version:**

Juliette Uranga-Chauvel. Comparaison des résultats de la vitrification et de la congélation lente des embryons au stade clive précoce (j2-j3) : étude rétrospective cas-témoin. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01411316

HAL Id: dumas-01411316

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01411316

Submitted on 7 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BORDEAUX
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2016 **Thèse n°108**

THESE
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE

DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Mercredi 5 octobre 2016 à BORDEAUX

Par

Juliette URANGA-CHAUVEL

Née le 24 novembre 1988 à Bruges (33)

COMPARAISON DES RESULTATS DE LA VITRIFICATION ET DE LA CONGELATION LENTE DES EMBRYONS AU STADE CLIVE PRECOCE (J2-J3) : ETUDE RETROSPECTIVE CAS-TEMOIN

Directeur de thèse :
Monsieur le Professeur Clément JIMENEZ

Jury

Mme le Professeur Dominique BREILH, PU-PH	**Présidente**
Mme le Docteur Lucie CHANSEL-DEBORDEAUX, AHU	**Membre**
Mme le Docteur Aline PAPAXANTHOS, PH	**Membre**
Mme le Docteur Volcy SOULA, PH	**Membre**
M. le Professeur Clément JIMENEZ, PU-PH	**Directeur**

Tous vos rêves peuvent devenir réalité
si vous avez le courage de les poursuivre.

Walt Disney

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Dominique Breilh,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de présider ce jury. Je vous remercie de m'avoir soutenue dans mon choix de spécialisation ainsi que pour vos conseils avisés dans l'élaboration de ma maquette d'IPR. Merci également pour la qualité et la rigueur de vos enseignements durant mon cursus en pharmacie.

A Monsieur le Professeur Clément Jimenez,

Un immense merci d'avoir rendu possible ce projet qui me tenait tant à cœur : « travailler en biologie de la reproduction », sans vous ce rêve n'aurait jamais pu se réaliser.

Merci d'être un chef aussi compréhensif et proche de ses internes. Merci pour vos qualités humaines, pour ces discussions enrichissantes, ces déjeuners à l'internat qui ont rendu ces 7 semestres inoubliables.

Je vous remercie également pour votre soutien, votre disponibilité et votre aide dans la réalisation de ce travail.

A Madame le Docteur Lucie Chansel-Debordeaux,

A tous ces bons moments passés ensemble à l'hôpital ou à la fac, à nos mémoires sur l'expérimentation animale qu'il faudra quand même se décider à écrire !

Merci pour ta formation, ta disponibilité et tes précieux conseils.

Merci de m'avoir intégrée à ton projet de thèse et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Ta persévérance et ta ténacité sont pour moi un exemple à suivre.

A Madame le Docteur Aline Papaxanthos,

Un grand merci pour l'enseignement et la formation que vous m'avez apporté tout au long de mon internat. Merci de m'avoir associée aux différents projets que vous suivez. Votre investissement et votre rigueur sont des qualités que je m'efforcerai de suivre.

A Madame le Docteur Volcy Soula,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Merci pour ton soutien et ton écoute notamment au cours de cette dernière année d'internat où il n'a pas toujours été facile de tout mener de front. Je tenais à te remercier également pour tes conseils et ton aide dans l'élaboration de cette thèse.

A Rémi, merci pour ton soutien pendant toutes ces années, pour ton coaching dans les moments de doute. Merci de rendre ma vie si belle. Merci pour ton amour. Nous avons grandi, évolué et suivi des parcours similaires que nous avons la chance de terminer ensemble. J'ai hâte de débuter cette nouvelle vie à tes côtés, je sais qu'elle sera merveilleuse.

A mes parents, merci d'avoir toujours cru en moi, merci pour votre soutien sans faille, pour votre écoute, votre disponibilité à n'importe quel moment. Merci de m'avoir toujours encouragée dans mes choix ; merci pour votre aide et vos précieux conseils dans tous les domaines ! Aux révisions, aux bons petits plats, aux coups de téléphone à vélo, à nos longues discussions, à notre relation incroyable… Je vous aime !

A mes beaux-parents, merci de m'avoir aussi bien accueillie dans votre grande famille. Merci pour tous ces bons moments partagés, pour votre soutien et votre intérêt pour mon travail. Merci de m'avoir guidée dans mes choix, je n'en serais pas là aujourd'hui.

A mes formidables belles-sœurs et beau-frère : Caroline, Hélène, Chloé, Noémie, Lucas et Elsa. J'ai de la chance de vous avoir. Merci de m'avoir intégrée à votre belle fratrie.

A mes grands-parents (Amatchi, Aitachi et Amatchi), à Nanette qui auraient été fiers de moi. Vous êtes à jamais dans mon cœur.

A Marie et Jennifer pour cette longue et belle amitié. A tous nos souvenirs d'ado, à nos fous-rires, à nos petits restos… Merci Marie pour toutes tes attentions, pour ton écoute inébranlable. Merci Jen pour ta complicité et tes scénarios qui me font toujours autant rire.

A Marion pour ton écoute, ton soutien et tes encouragements dans ce parcours que tu connais bien ; A Claire pour ta bienveillance et ton amitié indéfectible.

A Laura, à notre amitié depuis l'école primaire. Merci pour ta bonne humeur et ton grain de folie.

A Julien pour nos délires les plus improbables et ta curiosité ; A Pier pour ton dynamisme et ton côté fou-fou ; A Claire pour ta gentillesse et ton côté girly ; A Marc et nos papotages ; A Benoit et la questionnette…

A mes pharmachiennes adorées, Marion, Marine et Leslie. A notre amitié depuis la deuxième année, à nos séjours à Saint Jean, Paris, Guadeloupe…
Sans oublier Francis pour compléter la dream team ! Vous avez rendu ces années d'études géniales !!!

A toute la bande, quelle chance d'avoir de si chouettes amis : Adeline, Laurie-Anne et Thomas, Romain et Laure, Yann, Pierrick, Cédric, Charles et Ségo, Arnaud et Isabelle, Mathieu, Matthieu, Chloé et Fred, Rémi et Pauline.

A l'équipe de choc de BDR : Mariya, Vincent et Pierre ! Quel plaisir d'avoir partagé cette dernière année avec vous trois, une vraie belle rencontre ! Merci pour tous ces délires, ces bizutages, cette solidarité ; vous allez me manquer…

A mes co-internes : Véro et Audrey : à notre semestre en hygiène riche en rigolades ; Anne et Marie : à ce sympathique premier semestre en BDR ; A Jess : à nos gros délires, nos tournages, nos discussions de filles ; A Aurore : à nos cultures cellulaires et nos longues discussions à l'internat ; à Clotilde ; Irène ; Camille et Edouard pour nous avoir supportés et soutenus durant ce dernier semestre.

A l'équipe de l'IMN que j'ai côtoyée tout au long de mon internat avec de nombreux allers-retours entre l'hôpital et la fac. Merci plus particulièrement à Erwan, Marie-Laure, Evelyne, Marie-Hélène, Nathalie, Marie-Laure, Federico, Fares, Simone pour votre aide et votre gentillesse au cours des différents projets.

Merci à toute l'équipe du service de BDR-CECOS qui m'a tout de suite bien intégrée. Merci pour votre formation, pour les fous-rires, les repas pizzas… Merci à Monique pour tes enseignements et ta bienveillance ; au duo de choc irremplaçable Anna et Marianne ; à Jérôme, Nicolas, Marie-Caroline, Véro, Pascale, Cathy, Patricia, Marie-Caroline, Corinne, Hervé, Sylvie, Maïté, Jean-François et Didier.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS 8
LISTE DES ABREVIATIONS 10
INTRODUCTION 11
PREMIERE PARTIE : MISE AU POINT SUR LA CONGELATION EMBRYONNAIRE 12
1. Historique de la congélation embryonnaire 13
2. Importance de la congélation embryonnaire dans le parcours d'Assistance Médicale à la Procréation 14
3. Stratégies de transfert embryonnaire 15
4. Principes généraux de cryobiologie 17
4.1. Nucléation et cristallisation 17
4.2. Dommages cellulaires induits par la cristallisation 20
4.2.1. Choc thermique 20
4.2.2. Cristallisation de l'eau 21
4.2.3. Effets osmotiques 24
4.2.4. Autres dommages 24
4.3. Protection des cellules au cours de la congélation 25
4.3.1. Cryoprotecteurs 25
4.3.2. Vitesses de refroidissement 27
4.3.3. Induction de la cristallisation 28
4.3.4. Autres moyens de protection des cellules 28
5. Différentes techniques de congélation embryonnaire 29
5.1. La congélation lente 29
5.1.1. Principe 29
5.1.2. Cryoprotecteurs utilisés 30
5.1.3. Décongélation 30
5.2. La vitrification 31
5.2.1. Principe 31
5.2.2. Cryoprotecteurs utilisés 32
5.2.3. Vitesse de refroidissement et dispositifs utilisés 33
5.2.4. Réchauffement 34
5.3. Congélation lente versus vitrification 34

6. Résultats des transferts d'embryons congelés en France 35
7. Facteurs influençant les résultats des transferts d'embryons congelés 36
8. Comparaison de la congélation lente et de la vitrification pour la congélation des embryons clivés précoces (J2-J3) 38
9. Pratiques au CHU de Bordeaux 39
DEUXIEME PARTIE : COMPARAISON DES RESULTATS DE LA VITRIFICATION ET DE LA CONGELATION LENTE DES EMBRYONS AU STADE J2-J3 40
1. Matériels et méthodes 41
1.1. Profil de l'étude 41
1.2. Tentatives « en frais » 43
1.3. Congélation embryonnaire par vitrification ou congélation lente 44
1.4. Décongélation embryonnaire 46
1.5. Tentatives de transfert d'embryon(s) congelé(s) (TEC) 47
1.6. Expression des résultats 48
1.7. Analyse statistique des données 48
2. Résultats 49
3. Discussion 54
4. Conclusion 58
BIBLIOGRAPHIE 59

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Etapes du développement embryonnaire préimplantatoire et cinétiques de division selon le consensus européen d'Istanbul de 2011. 16

Figure 2 : Courbe de congélation de l'eau mettant en évidence l'état de surfusion. 18

Figure 3 : Représentation schématique des vitesses de nucléation (courbe de nucléation) et de croissance des cristaux (courbe de cristallisation) en fonction de la température.... 19

Figure 4 : Exemples de modifications pouvant survenir au niveau de la membrane plasmique lors d'un choc thermique..... 20

Figure 5 : Représentation schématique des événements physiques survenant lors de la congélation d'une cellule 22

Figure 6 : Représentation des taux de survie embryonnaire après décongélation en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée lors de la congélation. 27

Figure 7 : Représentation graphique de la pente de descente en température appliquée lors du processus de congélation lente. 29

Figure 8: Représentation des arrangements moléculaires survenant au cours de la congélation lente (A) et de la vitrification (B). 31

Figure 9 : Equation de Saragusty et Arav représentant la probabilité de vitrification. 32

Figure 10 : Principaux dispositifs utilisés pour la vitrification embryonnaire en système ouvert (A) ou fermé (B). 34

Figure 11 : Effets de l'âge de la femme à la ponction ovocytaire sur les résultats des tentatives de TEC. 36

Figure 12 : Représentation schématique de la constitution des deux groupes vitrification et congélation lente..... 42

Figure 13 : Schéma du montage des embryons en paillette pour la congélation des embryons en 2011. 44

Figure 14 : Schéma du montage des embryons en paillette pour la congélation des embryons entre 2012 et 2014. 45

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Principales différences entre les techniques de congélation lente et de vitrification..... 35

Tableau 2 : Caractéristiques des groupes vitrification et congélation lente. 51

Tableau 3 : Comparaison des données des TEC entre le groupe vitrification et CL. 52

Tableau 4 : Comparaison des données des TEC où 100 % des embryons transférés étaient intacts entre le groupe vitrification et CL. 53

Annexe 1 : Taux de transfert par cycle de décongélation initié après vitrification ou congélation lente d'embryons précoces. 65

LISTE DES ABREVIATIONS

ABM : Agence de Biomédecine

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

BDR : Biologie De la Reproduction

CECOS : Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humains

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CL : Congélation Lente

DMSO : Diméthylsulfoxide

DO : Don d'Ovocytes

DS : Dilution Solution

EFM : Embryo Freezing Medium

EG : Ethylène Glycol

ES : Equilibration Solution

eSET : elective Single Embryo Transfer

FCS : Fausse Couche Spontanée

FIV : Fécondation In Vitro

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

hCG : human Chorionic Gonadotropin

HSA : Human Serum Albumin

ICSI : IntraCytoplasmic Sperm Injection

LH : Luteinizing Hormone

SA : Semaines d'Aménorrhée

SOPK : Syndrome des Ovaires PolyKystiques

TEC : Transfert d'Embryons Congelés

TESE : Testicular Sperm Extraction

TS : Thawing Solution

VS : Vitrification Solution

WS : Washing Solution

INTRODUCTION

Depuis les premiers succès de grossesse après congélation d'embryons humains par Trounson en 1983 (1) et Zeilmaker en 1984 (2), la technique de congélation embryonnaire s'est rapidement développée et améliorée pour occuper, aujourd'hui, une place importante dans la prise en charge d'un couple infertile en parcours d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP). En effet, son indication principale concerne la cryopréservation du (des) embryon(s) surnuméraire(s) obtenus lors d'une tentative de Fécondation In Vitro (FIV) permettant ainsi d'augmenter les chances de grossesse par leur transfert intra-utérin ultérieur après leur décongélation en cas d'absence de grossesse lors du transfert d'embryon(s) frais (3).

Deux méthodes de congélation ont été développées et peuvent être utilisées : la congélation dite « lente » qui est la technique la plus ancienne et la vitrification autorisée en France depuis 2011.

De nombreuses études comparant ces deux techniques rapportent une supériorité de la vitrification en ce qui concerne le taux de survie embryonnaire après décongélation. Cependant, concernant les taux de grossesse évolutive et de naissance vivante, les résultats sont discordants selon les auteurs, notamment pour les embryons clivés précoces (embryons à J2-J3 après la fécondation) (4).

L'objectif de ce travail est d'analyser et de comparer les résultats des transferts d'embryons congelés au stade précoce après vitrification ou après congélation lente dans notre centre en termes de taux de naissance vivante par embryon décongelé afin d'évaluer au mieux la technique offrant le plus de succès pour un couple.

Nous ferons, dans un premier temps, une mise au point sur la congélation embryonnaire en Assistance Médicale à la Procréation ; puis, dans un deuxième temps, nous présenterons l'étude menée dans le service de Biologie De la Reproduction (BDR)-CECOS du CHU de Bordeaux concernant la comparaison des résultats de la vitrification et de la congélation lente des embryons au stade J2-J3.

PREMIERE PARTIE : MISE AU POINT
SUR LA CONGELATION EMBRYONNAIRE

1. Historique de la congélation embryonnaire

Le 25 juillet 1978 naissait, en Angleterre, Louise Brown, premier enfant au monde conçu par Fécondation In Vitro et transfert embryonnaire dans l'utérus maternel. Cette naissance, fruit du travail du biologiste Robert Edwards et du gynécologue Patrick Steptoe, constituait une extraordinaire avancée scientifique et médicale. A cette époque, les systèmes de cryopréservation de l'embryon humain n'étaient pas encore au point chez l'homme et il fallut attendre cinq années avant d'obtenir la première grossesse après le transfert d'un embryon congelé (1) et une année supplémentaire pour que Zoé premier enfant conçu grâce à la FIV et la congélation embryonnaire, voit le jour en Australie (2).
Ces premières équipes utilisaient alors un protocole de congélation lente avec du diméthylsulfoxide (DMSO) comme cryoprotecteur.
Depuis lors, la technique de congélation embryonnaire n'a cessé de se développer à travers le monde grâce à différents protocoles permettant la congélation d'embryons humains à tous les stades de développement : zygotes (embryon avec deux pronoyaux), clivés précoces (J2-J3) ou blastocystes (J5-J6).
La vitrification embryonnaire, protocole de congélation ultrarapide, a émergé dans le domaine de l'AMP dans les années 1990 comme alternative à la congélation lente (5,6).
Suscitant de nombreuses réticences en France quant à un éventuel risque sanitaire et une toxicité des cryoprotecteurs utilisés à fortes concentrations, cette technique n'a été autorisée dans le pays qu'en 2011 après expertise de la littérature concernant son apport sur le taux de survie embryonnaire après décongélation (4,7) et son innocuité pour les enfants nés (8).

Aujourd'hui les techniques de congélation embryonnaire par congélation lente ou vitrification sont largement utilisées dans les centres d'AMP et constituent une étape incontournable lors d'une tentative de FIV.

2. Importance de la congélation embryonnaire dans le parcours d'Assistance Médicale à la Procréation

Depuis plusieurs décennies, les progrès dans le domaine de l'AMP, tant au niveau clinique avec l'amélioration des protocoles de stimulation de l'ovulation qu'au niveau biologique avec le développement de nouvelles techniques, de nouveaux critères de sélection embryonnaire et l'optimisation des conditions de culture, ont permis d'augmenter le nombre d'embryons viables obtenus après une tentative de FIV conventionnelle ou d'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) (9).

En parallèle, l'essor de la politique du transfert d'un seul embryon (eSET pour elective Single Embryo Transfer), visant à limiter le nombre de grossesses multiples et ses risques obstétricaux, a également entraîné une augmentation du nombre d'embryons surnuméraires susceptibles d'être congelés. (10).

La congélation de ces embryons surnuméraires étant donc nécessaire, la maîtrise de cette technique est essentielle car elle permet d'augmenter les chances de grossesse pour un couple en proposant le transfert ultérieur de ces embryons congelés s'il n'y a pas eu de grossesse lors du transfert frais. Ces tentatives de transfert d'embryons congelés (TEC) permettent, en effet, plusieurs cycles de transfert embryonnaire (frais puis congelés) à partir d'un seul cycle de stimulation. De plus, en cas de naissance à la suite du transfert frais, les embryons congelés peuvent également être utilisés si le couple désire un nouvel enfant.

Une technique de congélation embryonnaire optimale permet donc de congeler un plus grand nombre d'embryons, de favoriser la pratique du eSET, d'augmenter le taux cumulé de grossesse (pourcentage de grossesse après le transfert d'embryons frais + le transfert d'embryons congelés) tout en diminuant le nombre de stimulations et de ponctions ovariennes par patiente.

La congélation embryonnaire a donc pris une importance indéniable dans la qualité de la prise en charge d'un couple infertile en AMP.

3. Stratégies de transfert embryonnaire

La stratégie de transfert embryonnaire prend en compte de multiples facteurs comme, par exemple, l'âge de la patiente, le rang de la tentative, la provenance des gamètes (ponction testiculaire, don d'ovocytes…), la qualité embryonnaire, les moyens techniques (incubateurs, milieux permettant la culture prolongée), le résultat des précédentes tentatives ou encore le souhait du couple. L'ensemble de ces facteurs détermine le nombre d'embryons ainsi que le stade embryonnaire pour le transfert.

Dans la plupart des centres, le transfert embryonnaire (frais ou congelé) est réalisé soit au stade d'embryon clivé précoce (J2 ou J3) soit au stade tardif de blastocyste (J5 ou J6). La Figure 1 résume les différentes étapes du développement embryonnaire depuis la mise en contact des gamètes jusqu'au stade de blastocyste, obtenu après 5 jours de culture in vitro, en précisant les cinétiques de division pour l'évaluation morphologique des embryons préimplantatoires déterminées par le consensus d'Istanbul de 2011 (11).

Plusieurs études ont comparé ces deux stratégies de transfert : J2-J3 versus blastocyste. Guérif *et al.,* en 2009, retrouvaient un pourcentage plus important de grossesses évolutives après le transfert frais d'un seul blastocyste, par comparaison au transfert d'un embryon clivé précoce ; cependant, aucune différence significative n'était retrouvée entre les deux stades concernant le taux de grossesse cumulé (3). Une revue de la Cochrane en 2012 retrouvait des taux cumulés de grossesse clinique supérieurs pour les embryons J2-J3 (12). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'un plus grand nombre de cycles avec congélation étaient obtenus pour le stade J2-J3 avec plus d'embryons congelés, permettant d'augmenter le nombre de TEC.
En effet, il faut tenir compte du risque d'échec de la culture prolongée et de l'absence de transfert ou de congélation dans le cas d'une stratégie utilisant le stade de blastocyste (13).

La stratégie de transfert frais (stade précoce versus tardif) influence le plus souvent le stade embryonnaire à la congélation et donc le stade au moment du transfert d'embryon(s) congelé(s). En effet, si un centre choisit une stratégie de transfert

d'embryon clivé précoce (J2-J3), les embryons surnuméraires de la cohorte seront, dans la majorité des cas, congelés au même stade (J2-J3).
Cependant, certains centres préfèrent réaliser des transferts frais à un stade précoce puis laisser en culture les embryons restants et congeler seulement les embryons qui auront évolué jusqu'au stade de blastocyste. Dans ce cas, les embryons transférés en frais et ceux transférés après décongélation n'auront pas le même stade embryonnaire.

Selon le rapport de l'Agence de Biomédecine (ABM) de l'année 2013, la culture prolongée est pratiquée en France dans plus de 20 % des tentatives de FIV et dans 32 % des TEC. Son utilisation est extrêmement variable selon les centres (de 1 à 100 % des tentatives) (14).
Bien que le recours à la culture prolongée ait fortement augmenté ces dernières années, le stade embryonnaire J2-J3 reste celui majoritairement congelé à l'heure actuelle en France (14).

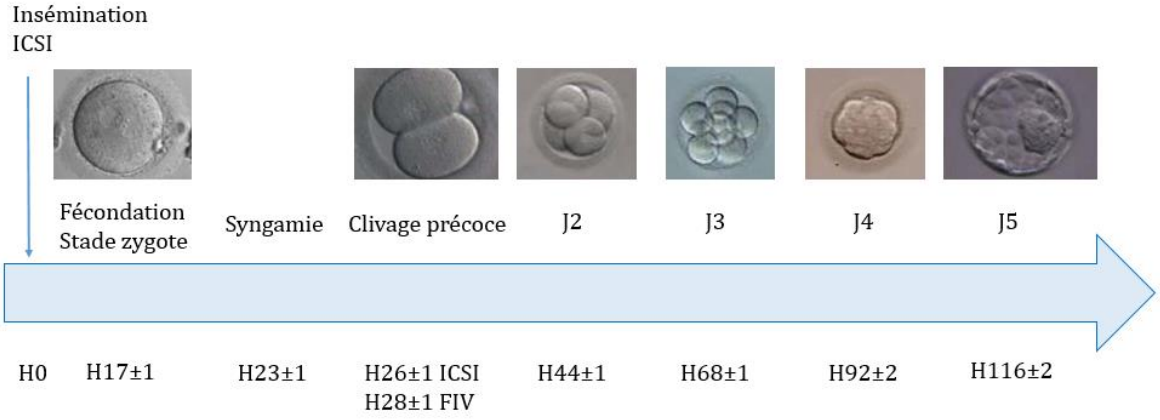


Figure 1 : Etapes du développement embryonnaire préimplantatoire et cinétiques de division selon le consensus européen d'Istanbul de 2011 (11).

4. Principes généraux de cryobiologie

L'eau à l'état liquide joue un rôle essentiel pour le fonctionnement de tout être vivant. Elle compose ainsi 60 à 85 % des cellules. Un embryon humain de trois jours est constitué, par exemple, de plus de 90 % d'eau Lorsque la température diminue, la transformation de l'eau liquide en glace s'accompagne de profonds changements des milieux extra et intracellulaire qui peuvent être délétères pour les cellules. La transition eau-glace est donc un phénomène d'importance critique en cryoconservation (15). Ainsi, il est important de maîtriser et de contrôler le changement de phase des molécules d'eau aussi bien lors du processus de congélation que lors de la décongélation.

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

4.1. Nucléation et cristallisation

Un cristal de glace est une structure solide composée de molécules d'eau toutes liées entre elles et agencées selon un motif se répétant à l'infini. Ce motif est représenté par une molécule d'eau centrale entourée par quatre molécules d'eau formant un tétraèdre. L'ensemble est relié par des liaisons hydrogènes établies entre un atome d'oxygène et deux atomes d'hydrogène. Lors de la cristallisation, on observe une augmentation du volume occupé par l'eau d'environ 9 % (liée à la structure tétraédrique de la glace). Au niveau cellulaire, cette dilatation peut engendrer des dommages irréversibles. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes de formation de la glace afin de pouvoir les contrôler.

Lors d'un refroidissement, la formation de glace requiert un phénomène de nucléation, c'est- à-dire la présence d'un événement permettant l'induction de la cristallisation (16). Deux types de nucléation existent. La première est la nucléation hétérogène où la formation de glace est induite par la présence d'une impureté, appelée noyau de nucléation. La température à laquelle la cristallisation a lieu dépend de la taille des sites de nucléation. Plus les noyaux de nucléation sont petits, plus la température de cristallisation est basse, et inversement. Lorsque la température de l'eau atteint -40°C, la

taille nécessaire pour qu'un noyau de nucléation induise la cristallisation est d'environ 1 nm, soit la taille d'un groupe aléatoire de molécules d'eau. A cette température, la glace se forme donc de manière spontanée. On parle alors de nucléation homogène.
Il faut noter que les températures de nucléation (homogène et hétérogène) sont abaissées en présence de solutés (16).

Dans la plupart des cas, l'eau n'est presque jamais congelée à sa température de cristallisation de 0°C due à la rareté de sites de nucléation de grande taille. L'eau non congelée à une température en dessous de son point de cristallisation est appelée « eau en surfusion » (Figure 2) (16).
L'état de surfusion est un état instable qui se maintient tant qu'il n'y a pas de cristallisation. Plus l'abaissement de la température de la solution par rapport à O°C est important au moment de la cristallisation, plus la structure de la glace est chaotique avec présence de cristaux de petite taille (10 µm) (17). Lorsque la cristallisation a lieu alors que l'état de surfusion est dit faible, la glace prend au contraire la forme de cristaux uniformes et de taille plus importante (10-30 µm). De plus, cette transition surfusion-cristallisation est une réaction exothermique pouvant aboutir à une réorganisation de la structure cristalline et engendrer des dégâts cellulaires. Il semble ainsi nécessaire de limiter autant que possible l'état de surfusion lors des protocoles de congélation (18).

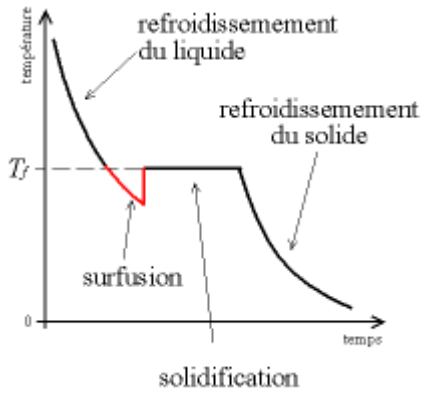


Figure 2 : Courbe de congélation de l'eau mettant en évidence l'état de surfusion d'après Lansac et Guérif, 2005 (19).
Tf = température de fusion/solidification de l'eau (0°C).

La croissance des cristaux de glace

Une fois la cristallisation initiée, la croissance des cristaux ainsi que la structure de la glace dépendent de la vitesse de refroidissement, de la température de cristallisation et de l'état de surfusion de la solution au moment de la cristallisation (16,17). La vitesse de cette croissance est schématisée dans la Figure 3.

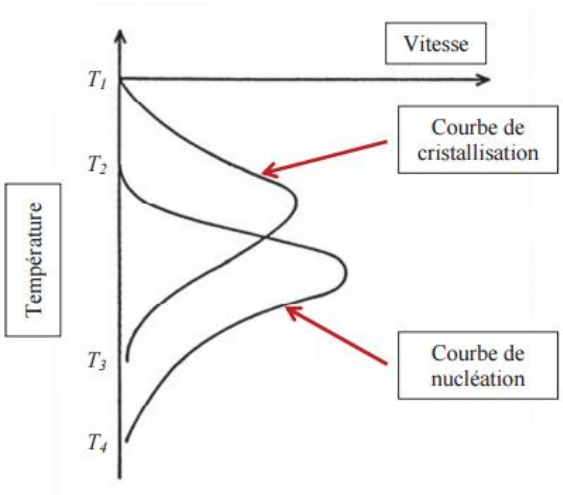


Figure 3 : Représentation schématique des vitesses de nucléation (courbe de nucléation) et de croissance des cristaux (courbe de cristallisation) en fonction de la température d'après Baudot *et al.* (20).

La croissance des cristaux dépend de la viscosité de la solution (15,21). Elle se produit par diffusion de molécules d'eau libres jusqu'au cristal. Une augmentation de la viscosité diminue donc la diffusion des molécules d'eau et la croissance des cristaux. Or, la viscosité des solutions aqueuses augmente lorsque la température baisse. Ainsi, lorsque la température baisse, la vitesse de croissance des cristaux augmente tout d'abord avant de diminuer du fait de l'augmentation de viscosité (Figure 3).

Il est important de rappeler que le phénomène de nucléation se situe à des températures plus basses que le phénomène de cristallisation. Lors d'un refroidissement lent, le début de la nucléation se produit alors que la vitesse de croissance des cristaux est déjà grande. Un refroidissement lent conduit donc à la formation d'un faible nombre de cristaux de grande taille. A l'inverse, un refroidissement rapide conduit à la formation de nombreux cristaux de petite taille (16).

Lors du réchauffement, la vitesse de nucléation augmente avant celle de cristallisation (Figure 3).La probabilité d'apparition de glace est donc plus importante au réchauffement qu'au refroidissement. Ceci explique en particulier que, lors des procédures de cryoconservation, les vitesses de réchauffement appliquées doivent être supérieures aux vitesses de refroidissement, en particulier lors des protocoles de vitrification.

4.2. Dommages cellulaires induits par la cristallisation

Lors d'un processus de refroidissement, les embryons peuvent subir des dommages morphologiques et fonctionnels considérables.

Ces dommages peuvent être liés principalement au choc thermique, à la cristallisation de l'eau ou à des effets osmotiques (22).

4.2.1. Choc thermique

Lors du processus de congélation, un refroidissement trop brusque peut exercer un effet néfaste sur les cellules. Il s'agit du choc thermique qui peut intervenir aussi bien au-dessus qu'au-dessous du point de cristallisation. La zone critique se situe entre + 15°C et -5°C.

Les lésions qui en résultent trouvent leur origine au niveau de la membrane cellulaire, du fait de la présence de contractions différentielles des composants membranaires, de fractures mécaniques ou de changements conformationnels de la topographie membranaire (Figure 4) (23).

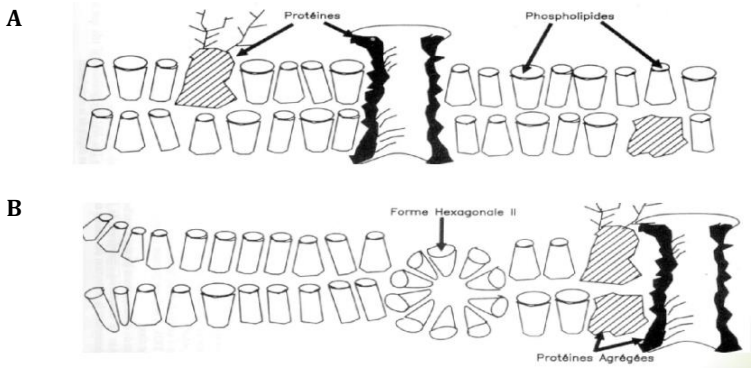


Figure 4 : Exemples de modifications pouvant survenir au niveau de la membrane plasmique lors d'un choc thermique. A : arrangement au hasard des phospholipides et des protéines. B : réarrangements au sein de la bicouche membranaire avec formation de micelles lipidiques et d'agrégats protéiques d'après Amann et Pickett (24).

4.2.2. Cristallisation de l'eau

La formation de cristaux de glace est une des causes majeures de dommages pouvant survenir au cours du processus de cryopréservation (16,22,25). Lors du refroidissement, les cristaux de glace se forment en premier dans le milieu extracellulaire (notamment lors d'un refroidissement lent), dû à l'absence de sites de nucléation de grande taille à l'intérieur de la cellule (16).
Plusieurs phénomènes sont à l'origine des altérations liées à cette formation.

Lésions mécaniques

L'apparition de glace extracellulaire est à l'origine de contraintes mécaniques sur les cellules (15). Les interactions entre cellules et cristaux de glace peuvent conduire à des dommages, en particulier aux points de contact entre les cristaux et la membrane plasmique (26). Néanmoins, la morphologie des cristaux est extrêmement dépendante des conditions expérimentales et les contraintes mécaniques peuvent donc varier fortement en fonction des protocoles de cryoconservation.

Augmentation des concentrations en solutés extra et intracellulaires

La formation de cristaux de glace dans le milieu extracellulaire s'accompagne d'une augmentation de la concentration en électrolytes dissous (16,27).
Il en résulte plusieurs phénomènes à l'origine de dommages cellulaires.

Premièrement, l'augmentation de la concentration en solutés extracellulaires engendre une sortie de l'eau intracellulaire et donc une déshydratation de la cellule (16). On parle d'effet de solution (Figure 5) (15,28).
Ainsi, une exposition à un milieu hyperosmotique peut entraîner des changements dans la perméabilité, l'intégrité et la fonction membranaire (27). En effet, lors de la déshydratation, les cellules se contractent et leurs membranes se déforment nettement.
De plus, la déshydratation des cellules peut entraîner une dénaturation des protéines et des phospholipides membranaires.
Une autre conséquence de la déshydratation intracellulaire est le rapprochement de molécules polaires séparées normalement par des molécules d'eau. Ce rapprochement

pourrait induire une altération de la structure de la membrane plasmique et des protéines intracellulaires.

Deuxièmement, l'augmentation de la concentration en solutés extracellulaires est à l'origine d'une augmentation de la concentration en solutés intracellulaires. Deux mécanismes sont à l'origine de ce phénomène. D'une part, la déshydratation intracellulaire résultant de l'effet de solution engendre une augmentation de la concentration des solutés présents dans le cytoplasme. D'autre part, l'augmentation de concentration extracellulaire peut être à l'origine du passage dans le cytoplasme de solutés extracellulaires initialement non pénétrants (16). L'hyperosmolarité intracellulaire qui en découle peut limiter sévèrement la tolérance des cellules lors de la suspension de celles-ci dans des milieux hypoosmotiques et augmenter les risques d'éclatement de la cellule par pénétration d'eau lors du réchauffement (16). De plus, l'augmentation de la concentration intracellulaire en sels peut provoquer la précipitation des protéines et les complexes lipoprotéiques qui forment la membrane peuvent être altérés (29). La cristallisation des sels tampons peut entraîner des variations importantes du pH et par suite une dénaturation irréversible des protéines.
L'augmentation de la concentration de certaines molécules ou ions peut entraîner une modification de l'équilibre osmotique nécessaire au bon fonctionnement cellulaire et provoquer des variations biochimiques potentiellement létales (30).

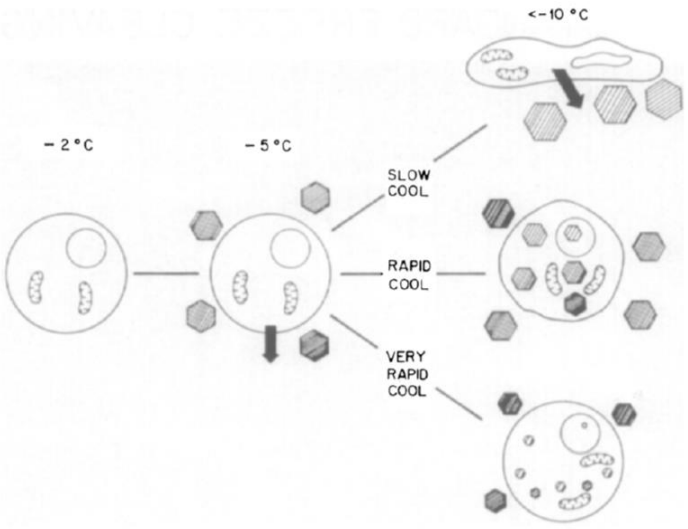


Figure 5 : Représentation schématique des événements physiques survenant lors de la congélation d'une cellule d'après Mazur (31)**. Les hexagones grisés représentent les cristaux de glace extra et intracellulaires.**

Cristallisation intracellulaire

La formation de glace intracellulaire, même dans des proportions très faibles, peut engendrer des dommages très importants (32). Il semble nécessaire de distinguer les phénomènes responsables de la formation de glace intracellulaire en fonction de la température de cristallisation (31) :

- A des températures inférieures à -40°C, le cytoplasme en surfusion atteint sa température de nucléation homogène et cristallise spontanément.
- A des températures comprises entre -40 et -30°C, cette formation est une conséquence de l'action de noyaux de nucléation hétérogène présents dans la cellule. La faible quantité de noyaux de nucléation présents dans le milieu intracellulaire explique les températures basses de cristallisation du liquide intracellulaire.
- Pour des températures supérieures à -30°C, les mécanismes sont encore méconnus. Plusieurs hypothèses existent concernant l'induction de la cristallisation intracellulaire par la présence de glace extracellulaire (16,31) :

-induction par le passage de glace extracellulaire (cristaux de petite taille, à basse température) au travers des pores de la membrane plasmique,

-induction par le passage de glace extracellulaire au travers des lésions de la membrane plasmique,

-induction par la glace extracellulaire de changements structuraux de la membrane plasmique permettant de transformer la surface interne de la membrane en site de nucléation hétérogène.

La glace intracellulaire peut endommager les cellules par des lésions mécaniques dues à la croissance du cristal, en particulier au niveau de la membrane plasmique ou des organites (16).

4.2.3. Effets osmotiques

Les dommages osmotiques sont liés aux différences de concentrations en cryoprotecteurs entre les milieux intra et extracellulaire et aux déséquilibres osmotiques qui en résultent (16,30,32). Ces dommages peuvent survenir lors de l'addition des cryoprotecteurs avant le processus de refroidissement et lors du retrait des cryoprotecteurs pendant le réchauffement.

En effet, lors du refroidissement, l'addition des cryoprotecteurs rend hypertonique la solution où sont placés les embryons. Les cryoprotecteurs utilisés possédant un coefficient de perméabilité membranaire inférieur à celui de l'eau, les cellules subissent dans un premier temps une contraction du fait de la sortie d'eau intracellulaire avant de ré-augmenter de volume du fait de la pénétration des cryoprotecteurs et de la rentrée concomitante d'eau (25).

A l'inverse, lors du retrait des cryoprotecteurs, les embryons sont placés dans une solution hypotonique du fait de la présence de cryoprotecteurs dans le milieu intracellulaire. Les cellules vont donc tout d'abord gonfler du fait de l'entrée d'eau avant de voir leur volume diminuer du fait de la sortie des cryoprotecteurs et d'une partie de l'eau intracellulaire (16).

Ainsi, les dommages osmotiques sont engendrés par des variations de volume, plus ou moins importantes en fonction de la concentration en cryoprotecteurs (21). Ces dommages peuvent être provoqués notamment par la rupture de la membrane plasmique par éclatement lors de la rentrée d'eau ou, au contraire, par des interactions avec le cytosquelette lors de la sortie d'eau (16).

4.2.4. Autres dommages

Les protocoles de cryoconservation sont également à l'origine d'un stress oxydant. L'augmentation de la concentration intracellulaire en radicaux libres oxygénés qui en résulte pourrait être à l'origine d'une peroxydation des phospholipides de la membrane plasmique et ainsi altérer le fonctionnement de cette dernière (33).

Le cytosquelette semble également être sensible au processus de refroidissement et de réchauffement et des dommages à son niveau sont souvent retrouvés (34,35).

4.3. Protection des cellules au cours de la congélation

Les principaux enjeux de la cryoconservation embryonnaire sont d'éviter, d'une part, la formation de cristaux de glace et, d'autre part, de trop fortes concentrations en solutés intracellulaires pouvant être létales pour la cellule tout en maintenant les capacités fonctionnelles des organites intracellulaires (36).

Différents moyens ont été mis en place afin de contrôler au mieux la période instable de changement de phase des milieux extra et intracellulaires lors du processus de congélation. Les principaux sont : l'ajout de cryoprotecteurs afin d'assurer une protection chimique et mécanique des cellules, le contrôle des vitesses de refroidissement et l'induction de la cristallisation.

4.3.1. Cryoprotecteurs

Un cryoprotecteur peut être défini comme une molécule dont la mise en contact avec des cellules avant leur cryoconservation permet d'augmenter leur taux de survie après décongélation (37).

Différents types de cryoprotecteurs peuvent être employés, associés ou non, pour la congélation des embryons humains. On distingue les cryoprotecteurs pénétrants qui peuvent traverser la membrane plasmique et s'équilibrer dans le cytoplasme de la cellule et les cryoprotecteurs non pénétrants qui restent dans le milieu extracellulaire (38).

Cryoprotecteurs pénétrants

Les cryoprotecteurs pénétrants, de faible poids moléculaire, peuvent facilement traverser la membrane cellulaire et possèdent une grande solubilité dans l'eau à basse température (38,39).

Ils ont un rôle d'antigel et assurent une protection mécanique et biochimique de l'embryon. En effet, ils protègent les cellules lors du refroidissement en limitant la cristallisation et l'effet de solution.

Concernant la cristallisation, les cryoprotecteurs pénétrants forment des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau et abaissent la température de cristallisation des solutions, limitant ainsi la formation de glace extracellulaire (38,39). Ils facilitent également la déshydratation du milieu intracellulaire par leur action osmotique et leur aptitude à diminuer la température de cristallisation (augmentation du temps de

déshydratation), ce qui limite la cristallisation intracellulaire (38). Il a enfin été évoqué un possible masquage des sites de nucléation (37).

Par ailleurs, les cryoprotecteurs pénétrants diminuent la concentration des solutés intracellulaires (37). Ils réduisent, en effet, la quantité de glace intracellulaire et agissent également comme un second solvant pour les sels. Les cryoprotecteurs pénétrants diminuent donc les dommages dus à l'effet de solution (31).

Les plus fréquemment employés sont le DMSO, le 1,2-propanediol, l'éthylène glycol et le glycérol.

Cryoprotecteurs non pénétrants

Les cryoprotecteurs non pénétrants sont des molécules de haut poids moléculaire solubles dans l'eau et possédant un important coefficient osmotique. Ils agissent donc sur l'osmolarité du milieu extracellulaire. Il s'agit, la plupart du temps, de disaccharides tels que le saccharose ou le tréhalose, mais d'autres saccharides ou macromolécules (ficoll, dextran) peuvent également être utilisés (38).

Ces cryoprotecteurs possèdent différentes propriétés mises à profit dans les solutions de cryopréservation.

Premièrement, grâce à leur action osmotique, ils favorisent, lors du refroidissement, la déshydratation des cellules avant la cristallisation (38,39). Cette « pré-déshydratation » permet de diminuer le temps de contact avec les cryoprotecteurs pénétrants et donc leur toxicité et permet également de limiter l'état de surfusion du cytoplasme et donc la probabilité d'apparition de glace intracellulaire. Lors du réchauffement, ils jouent, au contraire, le rôle de tampon osmotique en empêchant une entrée massive d'eau dans les cellules qui pourrait provoquer leur éclatement (39).

Deuxièmement, les cryoprotecteurs non pénétrants jouent le rôle de stabilisateurs et/ou de protecteurs de la membrane plasmique, des protéines intracellulaires et de la zone pellucide (38).

Troisièmement, ils permettent de diminuer la quantité de glace extracellulaire. Cette propriété est corrélée à leur concentration et au type de cryoprotecteur utilisé.

Enfin, ils peuvent substituer une partie des cryoprotecteurs pénétrants présents dans les solutions de vitrification et donc diminuer leur toxicité (37).

Utilisés à fortes concentrations, les cryoprotecteurs peuvent être toxiques pour les cellules. Leur toxicité dépend du type de cryoprotecteur utilisé, de leur concentration, de la durée d'exposition et de la température appliquée (22,37).

Ils peuvent être à l'origine de plusieurs types de toxicité :

- Une toxicité par stress osmotique liée à la déshydratation cellulaire. Il est donc préférable, afin d'éviter un choc osmotique trop brutal, de réaliser une exposition progressive des cellules aux cryoprotecteurs par paliers de concentrations croissantes. De même, lors du réchauffement, les cryoprotecteurs doivent être éliminés progressivement par des lavages successifs (40).
- De plus, les cryoprotecteurs pénétrants peuvent être responsables d'une désorganisation réversible ou irréversible des microfilaments et microtubules du cytosquelette (34).

4.3.2. Vitesses de refroidissement

Le principe du contrôle des cinétiques de refroidissement repose sur le fait que, plus la vitesse de refroidissement est grande, plus la probabilité de formation de glace intracellulaire augmente, liée à une déshydratation incomplète de la cellule à cryoconserver. A l'inverse, une vitesse de refroidissement trop lente entraîne des contractions cellulaires très importantes, liées à la déshydratation et pouvant être létales pour la cellule. Il existe, pour chaque type cellulaire, une vitesse optimale de refroidissement (31). Les meilleurs taux de survie des embryons humains sont obtenus avec des vitesses de refroidissement de 0,2 à 1°C par minute (41) (Figure 6).

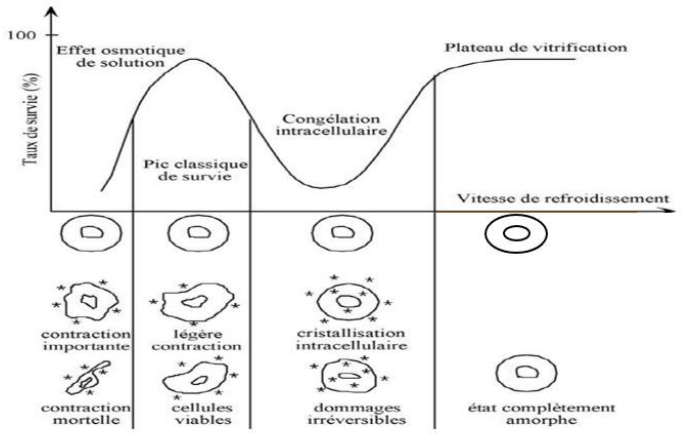


Figure 6 : Représentation des taux de survie embryonnaire après décongélation en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée lors de la congélation d'après Baudot *et al.* (20).

4.3.3. Induction de la cristallisation

L'induction de la cristallisation ou « seeding » est un artifice technique consistant à induire la nucléation c'est-à-dire l'apparition d'un premier cristal de glace dans le milieu extracellulaire (15). Cette technique permet ainsi de réduire l'état de surfusion et ses conséquences. Le seeding se réalise par l'apposition manuelle ou automatique d'un support refroidi dans l'azote liquide au contact de l'échantillon à congeler (18).
La température à laquelle est habituellement réalisée le seeding est située aux alentours de -7°C, quelques degrés seulement en dessous du point de cristallisation de l'eau pure. Le contrôle de la température du seeding est essentiel. Whittingham et al, ont montré chez les embryons de souris que le taux de survie embryonnaire était fortement diminué pour une température de seeding en dessous de -7°C et que ce taux devenait nul pour une température de -12°C (42).

4.3.4. Autres moyens de protection des cellules

Pour lutter contre le stress oxydant, l'addition d'antioxydants (comme l'ion ascorbate) dans les solutions de cryoconservation pourrait permettre d'améliorer les taux de survie embryonnaire après cryoconservation (33).

Le cytosquelette pouvant être fréquemment endommagé, sa stabilisation pourrait favoriser la survie des cellules cryoconservées (34,35,43). Différents stabilisateurs du cytosquelette existent et ont été utilisés lors de protocoles de cryoconservation. La cytochalasine B, en particulier, est un inhibiteur réversible de la polymérisation de l'actine. Elle permet la dépolymérisation temporaire des microfilaments présents dans les cellules et augmenterait ainsi la flexibilité du cytosquelette et de la membrane plasmique (35,38).

5. Différentes techniques de congélation embryonnaire

Deux techniques peuvent être utilisées pour la cryopréservation des embryons humains : la congélation lente et la vitrification.

5.1. La congélation lente

5.1.1. Principe

La congélation lente des embryons a été le premier protocole développé en se basant sur les principes de la cryobiologie selon lesquels la cinétique de refroidissement embryonnaire devait être faible (0,2 à 1°C/min) car des vitesses trop élevées entraînaient une diminution considérable du taux de survie embryonnaire (Figure 6) (41).

Cette technique consiste en une déshydratation lente et progressive de l'embryon, à température ambiante, par l'utilisation de cryoprotecteurs à faibles concentrations et par l'application d'une descente en température lente et contrôlée (44).

La Figure 7 résume les différentes étapes de la descente en température contrôlée à l'aide d'un appareil de congélation programmable. Celles-ci comprennent une première phase de refroidissement de 1 à 3°C/min, puis l'induction de la cristallisation ou « seeding » et une phase de descente en température contrôlée de 0,1 à 0,3°C/min. Les embryons sont par la suite plongés et stockés à -196°C dans l'azote liquide (Figure 7).

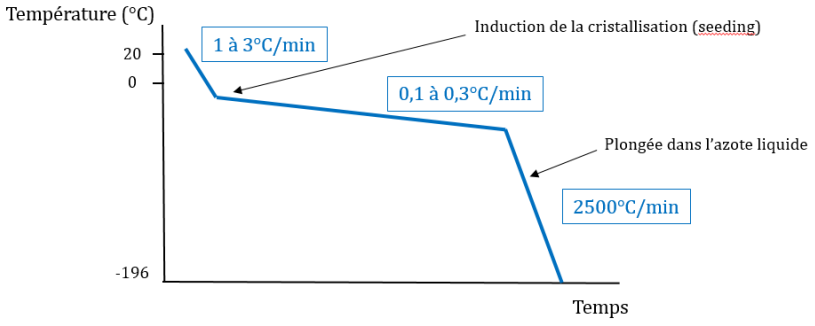


Figure 7 : Représentation graphique de la pente de descente en température appliquée lors du processus de congélation lente.

5.1.2. Cryoprotecteurs utilisés

Parmi les cryoprotecteurs pénétrants pouvant être utilisés lors des protocoles de congélation lente, on retrouve le DMSO (utilisé dans les premiers protocoles mais rapidement abandonné au vu de sa forte pénétrance et de sa toxicité), le 1,2-propanediol, l'éthylène glycol et le glycérol (préférentiellement utilisé pour la cryopréservation des embryons au stade blastocyste (45)).

En 1985, Lassalle *et al*. ont développé un protocole de congélation lente utilisant le 1,2-propanediol associé au sucrose pour la cryopréservation de l'embryon humain (46). L'ajout de cryoprotecteur non pénétrant a alors permis de réduire les durées de congélation/décongélation en permettant une déshydratation intracellulaire partielle à température ambiante.

Ce protocole est devenu, par la suite, la méthode de référence de congélation lente pour les embryons au stade précoce (J2-J3) dans de nombreux centres et n'a subi que très peu de modifications depuis (47).

5.1.3. Décongélation

La décongélation s'effectue à température ambiante par passage progressif des embryons dans des milieux contenant des concentrations décroissantes de cryoprotecteurs pénétrants et surtout non pénétrants afin d'éviter une réhydratation trop rapide lors du réchauffement.

5.2. La vitrification

Bien que la congélation lente ait permis d'optimiser le taux de grossesse cumulé, les résultats des tentatives de TEC restaient inférieurs à ceux obtenus lors d'un transfert frais. De nouvelles recherches ont été conduites dans le but d'améliorer ces résultats. Les travaux de Gordts en 1990 sur un nouveau protocole de cryopréservation embryonnaire ont présenté la vitrification comme une méthode de congélation innovante pouvant constituer une alternative à la congélation lente (6).

5.2.1. Principe

La vitrification est une procédure de congélation permettant de transformer un liquide en phase non cristalline, dite vitreuse, par une exposition à de fortes concentrations en cryoprotecteurs associée à une vitesse de refroidissement extrêmement rapide (2 000 à 30 000°C/min).

A la différence d'une structure cristalline, l'état vitreux est caractérisé par un arrangement moléculaire désordonné (Figure 8).

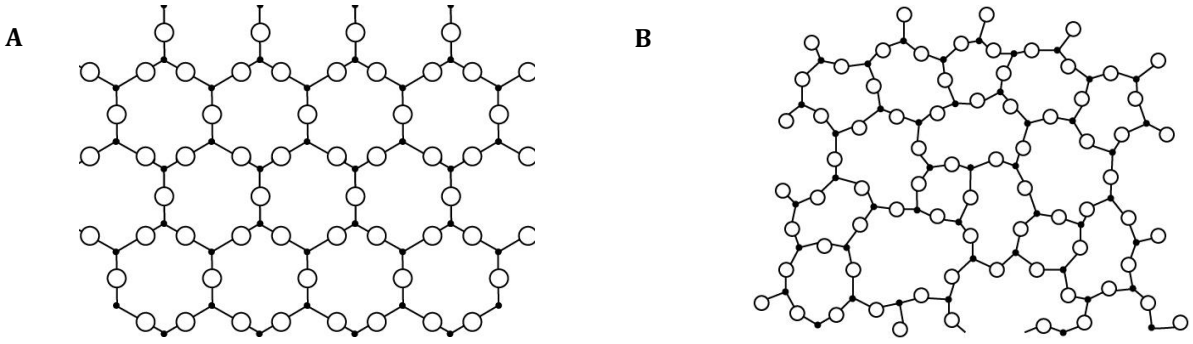


Figure 8: Représentation des arrangements moléculaires survenant au cours de la congélation lente (A) et de la vitrification (B).

En effet, la probabilité de vitrification est directement corrélée à la viscosité de l'échantillon (liée au type de cryoprotecteur utilisé), à la pente de descente en température et au volume de l'échantillon à vitrifier selon l'équation de Saragusty et Arav (43). Les conditions optimales associent donc un milieu très visqueux, une descente en température extrêmement rapide ainsi qu'un volume le plus faible possible (Figure 9).

$$\text{Probability of vitrification} = \frac{\text{Cooling rate} \times \text{Viscosity}}{\text{Volume}}$$

Figure 9 : Equation de Saragusty et Arav représentant la probabilité de vitrification (43).

Dans la majorité des protocoles, la vitrification consiste à exposer, en deux étapes, les embryons à des concentrations croissantes en cryoprotecteurs avant de les déposer sur le support de vitrification et de les plonger directement dans l'azote liquide à -196°C.

5.2.2. Cryoprotecteurs utilisés

Les cryoprotecteurs habituellement utilisés pour la vitrification sont composés d'agents pénétrants (DMSO, éthylène glycol…) et non pénétrants (sucrose). Dans de nombreux protocoles de vitrification, deux cryoprotecteurs pénétrants peuvent être associés afin d'utiliser les propriétés de chacun sans augmenter leur toxicité.
L'éthylène glycol est un cryoprotecteur pénétrant rapidement dans les cellules. Il limite donc les risques de choc osmotique et, bien que son aptitude à former un état vitreux ne soit pas optimale, sa faible toxicité en fait un des cryoprotecteurs de choix lors des protocoles de vitrification. A l'inverse, le DMSO permet facilement la formation d'un état vitreux mais sa toxicité est plus importante. Ces deux cryoprotecteurs sont donc fréquemment associés à concentrations égales dans les solutions de vitrification (48).

Dans certains protocoles, le milieu de vitrification peut être additionné de polymères de haut poids moléculaire comme la polyvinylpyrrolidone ou le ficoll.

L'utilisation de concentrations importantes de cryoprotecteurs très pénétrants et très visqueux permet une déshydratation embryonnaire rapide mais peut aussi être toxique pour les embryons. Une courte durée d'exposition à ces cryoprotecteurs est donc nécessaire afin d'éviter leur effet délétère potentiel sur la structure et les fonctions cellulaires (43).
De plus, l'utilisation de cryoprotecteurs non pénétrants et/ou de polymères permet de limiter la concentration intracellulaire des cryoprotecteurs pénétrants (49).

5.2.3. Vitesse de refroidissement et dispositifs utilisés

Saragusty et Arav ont mis en évidence l'effet bénéfique d'une augmentation significative de la vitesse de refroidissement sur la survie embryonnaire (43).
Ces vitesses de refroidissement sont influencées par le type de dispositif et le volume de l'échantillon à congeler.

Dans les protocoles de vitrification actuels, ultrarapides, les volumes de la solution de vitrification contenant le (les) embryon(s) sont inférieurs à 1 µl et utilisent des supports spécifiques permettant d'atteindre des vitesses de refroidissement avoisinant les 20 000°C/min.

Les premiers supports développés pour la vitrification embryonnaire correspondaient à des systèmes « ouverts » (6,50).
En exposant directement l'embryon (contenu dans un faible volume de solution) à l'azote liquide, ces dispositifs favorisaient la descente ultrarapide en température. Parmi les dispositifs ouverts, on retrouve, entre autres, des grilles de microscopie électronique, les hémi-paillettes, le système Cryoloop et Cryotop (Figure 10).

Cependant, certaines équipes ont mis en avant un possible risque de transmission microbiologique lié au contact direct des échantillons avec l'azote lors de la congélation et/ou de la conservation (51).
Conformément à la directive européenne du 31 mars 2004 (définissant les exigences du conseil de l'union européenne en matière de qualité et de sécurité, notamment pour la conservation et le stockage des cellules humaines), des systèmes aseptiques fermés ont été développés (52,53) comme, par exemple, le système Cryotip et les paillettes haute sécurité (Figure 10).

Plusieurs études ont comparé les résultats des taux de survie et de grossesse évolutive entre les systèmes ouverts et fermés pour la vitrification embryonnaire (53,54) et n'ont pas montré de différence significative entre les deux systèmes.

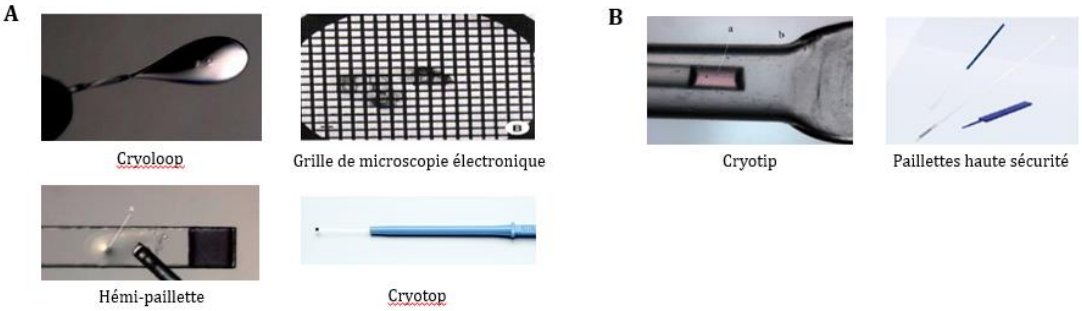


Figure 10 : Principaux dispositifs utilisés pour la vitrification embryonnaire en système ouvert (A) ou fermé (B).

5.2.4. Réchauffement

La décongélation des embryons vitrifiés se réalise par réchauffement rapide et réhydratation en immergeant les embryons dans des solutions de concentrations décroissantes en sucrose.

5.3. Congélation lente versus vitrification

La congélation lente et la vitrification diffèrent par leur principe même conduisant à la congélation des embryons, par les cryoprotecteurs utilisés mais aussi par le matériel nécessaire à leur réalisation, le temps consacré à la technique et leur coût (Tableau 1).

En effet, la congélation lente est une méthode longue et nécessitant l'acquisition et la maintenance d'un appareil de congélation avec descente en température programmée (55,56).

La vitrification, quant à elle, présente l'avantage de ne pas avoir besoin de recourir à ce type d'équipement (55). Cependant, cette technique nécessite un savoir-faire avec une période d'apprentissage incompressible (57) et présente une valeur ajoutée importante due essentiellement au coût des dispositifs et des kits de solutions mais aussi à la nécessité d'un nombre de cuves de stockage plus important.

Tableau 1 : Principales différences entre les techniques de congélation lente et de vitrification.

	Congélation lente	Vitrification
1ères grossesses/naissances chez l'homme	1983 Trounson 1984 Zeilmaker	1990 Gordts
Concentration en cryoprotecteurs	0,5-1,5 M	5-15 M
Temps d'exposition aux cryoprotecteurs	+++	+
Système de congélation	Appareil de congélation	Azote liquide
Dispositifs	Paillettes	Dispositifs adaptés (ouverts ou fermés)
Savoir-faire	Déjà acquis	Apprentissage nécessaire
Coût	+	+++

6. Résultats des transferts d'embryons congelés en France

Selon le rapport de l'Agence de Biomédecine de 2014, portant sur les résultats de l'année 2013 en France, 1 enfant sur 34 était issu de l'AMP cette année-là (2,9 % des naissances dans la population générale). Parmi ces enfants, 16 % étaient issus d'une congélation embryonnaire.

Depuis 2010, le nombre de tentatives de transfert d'embryons congelés en France est en augmentation (19 616 TEC en 2010 et 22 829 TEC en 2013). Ceci peut être la conséquence d'une évolution des pratiques avec, notamment, l'augmentation du nombre de tentatives de eSET. En effet, on observe, aussi bien pour les transferts d'embryons frais que congelés, une augmentation de la proportion du eSET passant de 28 % en 2010 à 37 % en 2013 lors des transferts frais et de 47 % en 2010 à 57 % en 2013 lors des tentatives de TEC.

Les résultats des TEC en intraconjugal, pour l'année 2013, sont de 20,5 % de grossesse échographique par transfert ; 16,4 % de grossesse évolutive par transfert et 15,8 % d'accouchement par transfert. Ces résultats sont en augmentation par rapport aux années précédentes (13,1 % d'accouchement par transfert en 2010) mais restent encore inférieurs à ceux obtenus après le transfert d'embryons frais (24,1 % d'accouchement par transfert en 2013 après une ICSI et 24,3 % d'accouchement par transfert en 2013 après une FIV conventionnelle) (14).

7. Facteurs influençant les résultats des transferts d'embryons congelés

Différents facteurs peuvent influencer les résultats des transferts d'embryons congelés. Certains sont communs aux cycles frais (l'âge de la femme, le nombre d'embryons transférés, la qualité embryonnaire, les étiologies de l'infertilité) et d'autres sont plus spécifiques aux cycles de TEC (le choix du stade de congélation embryonnaire, le taux de survie après décongélation, le protocole de congélation, les résultats des tentatives en frais).

Age de la femme

L'âge de la femme au moment de la ponction ovocytaire est un paramètre majeur influençant les résultats en FIV mais également lors des transferts d'embryons congelés. En effet, Oehninger *et al.* rapportaient, dans une étude, un taux de grossesse clinique par TEC de 32 % chez les femmes âgées de moins de 33 ans contre 13 % chez celles âgées de plus de 38 ans (p<0,001) (58).

De même, Wang *et al.* retrouvaient un taux d'implantation de 10,1 % versus 4 % respectivement chez les femmes âgées de moins de 30 ans et de plus de 40 ans (59).

Selon Salumets *et al.*, l'âge de la femme est le facteur clinique le plus important lors d'une tentative de TEC. Avec l'âge une diminution du taux de grossesse par transfert est observée ainsi qu'une augmentation du taux de fausse couche (Figure 11) (60).

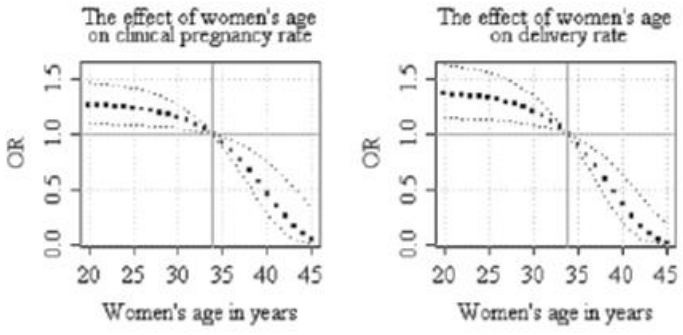


Figure 11 : Effets de l'âge de la femme à la ponction ovocytaire sur les résultats des tentatives de TEC. ODDS ratio calculé pour chaque groupe d'âge et comparé à un groupe de référence (femmes âgées de 33,9 ans en moyenne), d'après Salumets *et al.* (60).

Influence de la qualité embryonnaire

Il est largement démontré que les chances d'implantation des embryons congelés dépendent de leur qualité avant la congélation et du nombre de blastomères ayant survécu après la décongélation (61–63).

En effet, Edgar *et al.* retrouvaient un taux d'implantation similaire entre le transfert frais d'embryons clivés précoces et le transfert d'embryons clivés précoces intacts après décongélation. Le transfert d'embryons partiellement lysés après décongélation diminuait de 30 % le taux d'implantation, par comparaison au transfert frais d'embryons au même stade embryonnaire (61).

De même, pour l'étude conduite par El-Toukhy *et al.*, le taux d'implantation était significativement plus élevé après le transfert d'embryons ayant une survie totale qu'après le transfert d'embryons ayant une survie partielle (17,3 % vs 8,1 %) (64).

L'aspect morphologique des embryons avant la congélation influence très nettement le pronostic du TEC. Les critères les plus souvent employés dans les études pour définir la qualité embryonnaire sont le nombre et la régularité des blastomères ainsi que la proportion de fragments cytoplasmiques. Selon Check *et al.*, l'aspect morphologique des embryons avant la congélation conditionne leur survie après la décongélation. Il retrouvait, en effet, une survie plus importante pour les embryons présentant moins de 25 % de fragmentation, par comparaison à ceux présentant entre 25 et 50 % de fragmentation (63,6 % vs 52,8 % d'embryons ayant survécu dans chacun des groupes ; $p<0,05$) (65).

Certaines équipes tiennent compte également de la reprise de division des embryons après leur décongélation comme facteur pronostique des résultats en TEC. Un taux d'implantation de 10 % versus 4 % était retrouvé dans l'étude de Ziebe *et al.*, selon la reprise ou non de division des embryons transférés (66). De la même manière, Guérif *et al.* rapportaient un taux d'implantation par embryon transféré significativement plus élevé pour les embryons ayant repris leur division en comparaison aux embryons sans reprise de division (19,7 % vs 3 % ; $p<0,0001$) (67).

Etiologies d'infertilité

Pour Wang *et al.*, l'étiologie de l'infertilité du couple fait partie des facteurs pronostiques les plus importants influençant le taux d'implantation après transfert d'embryons congelés. Il rapporte, notamment, un taux d'implantation significativement plus élevé chez les femmes de moins de 40 ans sans facteurs tubaires (10,2 %) que chez des femmes du même âge avec une infertilité d'origine tubaire (8,2 %) (59).

Valeur pronostique du transfert d'embryons frais

Les résultats du cycle frais dont les embryons sont issus ont été décrits comme un élément prédictif du succès en TEC. En effet, les embryons congelés issus d'un cycle frais ayant conduit à une grossesse ou issus d'une congélation réalisée dans le but de prévenir un syndrome d'hyperstimulation sont corrélés à de meilleurs résultats en TEC (68).

Dans l'étude de Lin *et al*., 24,1 % des patientes débutaient une grossesse à la suite d'un TEC dans le groupe ayant obtenu une grossesse clinique lors du cycle frais contre 8,5 % dans le groupe n'ayant pas eu de grossesse en cycle frais. Le taux de grossesse plus élevé dans le premier groupe reflétant une qualité probablement supérieure de la cohorte embryonnaire (embryons frais et congelés) (69). De même, Wang *et al*. constataient un taux d'implantation après TEC de 14,2 % versus 8,6 %, respectivement chez les patientes de moins de 40 ans enceintes versus non enceintes lors du transfert d'embryons frais (59).

8. Comparaison de la congélation lente et de la vitrification pour la congélation des embryons clivés précoces (J2-J3)

Différentes méta-analyses ont comparé la congélation lente et la vitrification pour la congélation embryonnaire (4,7,70) et ont montré une augmentation du taux de survie pour les embryons vitrifiés. En ce qui concerne le taux de grossesse, leurs résultats sont discordants : AbdelHafez *et al*., en 2010, retrouvaient une supériorité de la vitrification concernant le taux d'implantation et les taux de grossesse clinique et évolutive pour les embryons clivés et les blastocystes, tandis que Kolibianakis *et al.*, en 2009, n'avaient pas mis en évidence de différence significative entre la vitrification et la congélation lente pour le taux de grossesse clinique.

De plus, des désaccords existent entre les études analysant la meilleure méthode pour la cryopréservation des embryons humains au stade clivé (J2/J3). Certaines, dont la plupart étaient des études randomisées, retrouvent un taux de survie plus important après vitrification (71–75) ainsi qu'un taux d'implantation supérieur pour les embryons vitrifiés (72,74,75). D'autres ne montrent pas de différence significative entre les deux méthodes concernant le taux de survie (76,77), le taux d'implantation ou les naissances vivantes (73,76,77).

9. Pratiques au CHU de Bordeaux

Les premières congélations embryonnaires par vitrification pour les embryons J2/J3 dans le service de BDR-CECOS, au CHU de Bordeaux, ont débuté en mars 2014 puis, au vu des résultats encourageants concernant le taux de survie embryonnaire après décongélation, un changement de pratique s'est opéré au 1er janvier 2015, date à partir de laquelle tous les embryons, quel que soit leur stade de développement, ont été congelés par la technique de vitrification.

Dans notre étude, la comparaison entre les deux techniques de congélation s'est faite sur les embryons au stade J2-J3 de leur développement, stade préférentiellement utilisé dans le service (en 2015 : 77 % des congélations concernaient des embryons J2-J3 ; 82 % en 2014).

De plus, bien que de nombreuses études s'accordent sur la supériorité de la vitrification pour la congélation des embryons au stade tardif de blastocyste (56,78); les avis divergent encore concernant les embryons clivés au stade précoce (J2-J3) pour lesquels la congélation lente apporte des résultats satisfaisants (47).

Ces résultats suggèrent l'intérêt de conduire de nouvelles études afin de confirmer le possible bénéfice de la vitrification pour la cryopréservation des embryons à J2-J3.

L'étude réalisée ici a pour but de vérifier l'hypothèse selon laquelle la vitrification embryonnaire est supérieure à la congélation lente en ce qui concerne le taux de survie embryonnaire mais également le taux de naissance vivante par embryon décongelé.

DEUXIEME PARTIE : COMPARAISON DES RESULTATS DE LA VITRIFICATION ET DE LA CONGELATION LENTE DES EMBRYONS AU STADE J2-J3

1. Matériels et méthodes

1.1. Profil de l'étude

Nous avons réalisé une étude rétrospective et monocentrique au sein du service de BDR-CECOS du CHU de Bordeaux, de type cas-témoin.

Toutes les tentatives de transfert d'embryons congelés (TEC) au stade précoce (J2-J3) après vitrification au cours de l'année 2015 ont été incluses dans l'étude à l'exception du don d'ovocytes et du risque viral. Les TEC réalisés en 2015 mais pour lesquels la vitrification avait eu lieu en 2014, ont également été exclus.

Chaque tentative de TEC après vitrification a été appariée avec une tentative témoin de TEC après congélation lente réalisée entre début 2011 et fin 2014.

Différentes tentatives de TEC pouvaient correspondre au même couple dans le cas où plusieurs TEC avaient été réalisés à la suite du transfert frais et de la congélation des embryons. Cependant, une patiente ne pouvait pas être son propre témoin.

L'appariement des cas « vitrification » et des témoins « congélation lente » (CL) a été établi à partir des critères suivants :

- l'âge de la femme au moment de la ponction ovocytaire,
- l'indication du recours à la FIV,
- le rang de la tentative en frais (un rang 1 était attribué à toute nouvelle tentative survenant après la naissance d'un enfant par FIV),
- la qualité embryonnaire basée sur le nombre d'embryons congelés par tentative (≤5 ; 6-10 ; >10),
- le nombre d'embryons transférés lors du TEC.

Le rang des tentatives de TEC ne constituait pas un critère d'appariement car la décongélation des embryons était réalisée au hasard.

Les données concernant les cycles de TEC mais aussi le cycle en frais ont été recueillies dans les deux groupes. A savoir :

- la date de la ponction et du (des) TEC,
- la technique de FIV utilisée (conventionnelle ou ICSI),
- l'origine du sperme (éjaculé frais, éjaculé congelé, TESE = Testicular Sperm Extraction),
- le nombre d'ovocytes ponctionnés et inséminés,
- le nombre d'embryons obtenus, transférés et congelés lors de la FIV,
- les issues de la tentative en frais et du (des) TEC,
- le protocole de stimulation utilisé lors du (des) TEC,
- le nombre d'embryons décongelés et transférés lors du (des) TEC,
- le nombre d'embryons 100 % intacts au moment de la décongélation.

Les données ont été recueillies, par un même investigateur, à partir des dossiers cliniques et biologiques du centre d'AMP du CHU de Bordeaux et du logiciel JFIV (Figure 12).

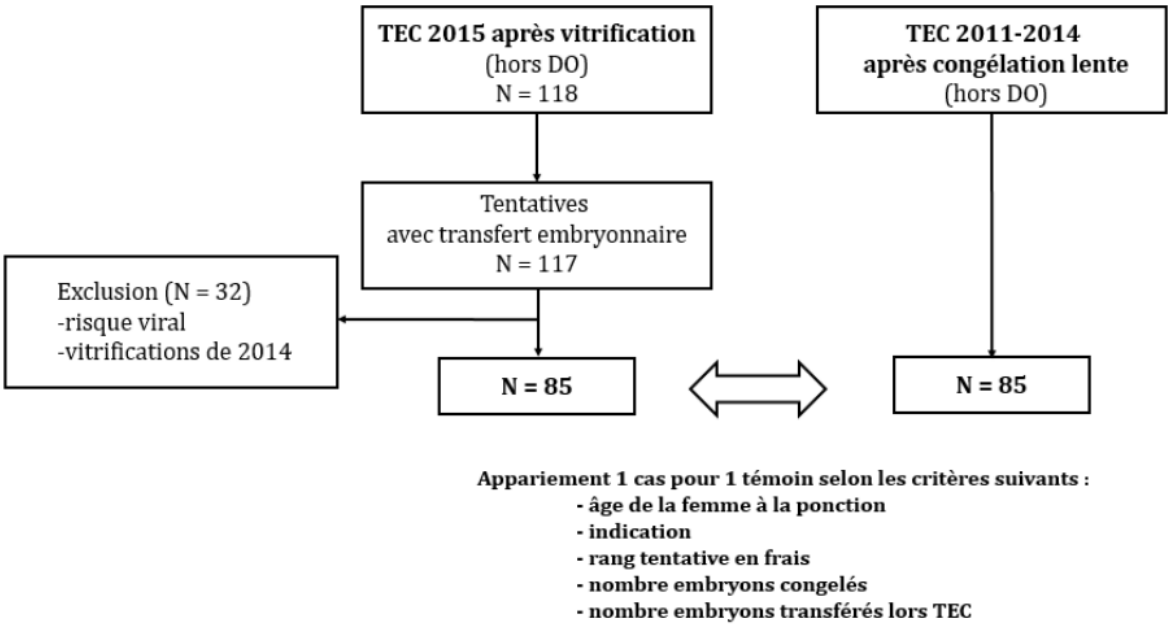


Figure 12 : Représentation schématique de la constitution des deux groupes vitrification et congélation lente.

1.2. Tentatives « en frais »

Les femmes étaient stimulées par des injections sous-cutanées de gonadotrophines pendant 12 jours en moyenne selon un protocole agoniste ou antagoniste. Un monitorage de la stimulation était effectué de façon régulière par un contrôle échographique ovarien et par un suivi biologique via le dosage plasmatique du 17 β œstradiol et de la LH (Luteinizing Hormone). Le déclenchement de l'ovulation était réalisé par une injection d'hCG (human Chorionic Gonadotropin) ou d'agoniste de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) lorsque les critères échographiques et biologiques étaient atteints. La ponction des follicules était faite, 36 heures après le déclenchement, au bloc opératoire sous sédation légère et anesthésie locale. Une administration de progestérone par voie vaginale était réalisée dès le soir de la ponction.

Selon la qualité spermatique, les spermatozoïdes étaient sélectionnés par gradient de densité ou par des techniques de lavages-centrifugations.

La fécondation des ovocytes était réalisée par FIV conventionnelle, par ICSI avec du sperme éjaculé frais, par ICSI avec du sperme congelé (don ou autoconservation) ou par ICSI avec des spermatozoïdes congelés issus de ponction testiculaire.

Tous les ovocytes et les embryons étaient mis en culture dans un milieu unique Global® additionné de Human Serum Albumin (HSA) à 7,5 % (JCD, La Mulatière, France) recouvert d'huile (Ovoil®, Vitrolife, Paris, France) et placés à 37°C sous 5,7 % de CO_2 dans des étuves tri-gaz.

La fécondation était observée 20h en moyenne après l'insémination par la présence de deux pronoyaux. Le développement embryonnaire était évalué à J2 (44-48h post-insémination) ou J3 (68-72h post-insémination). Selon la qualité embryonnaire, évaluée à l'aide des critères morphologiques suivants : le nombre et la régularité des blastomères ainsi que le pourcentage de fragmentation (<20 %, 20-50 %, >50 %), certains embryons étaient transférés en frais et d'autres congelés le jour du transfert. Seuls les embryons de qualité suffisante (embryons ayant ≥ 3 blastomères à J2 et ≥ 6 blastomères à J3 et < 50 % de fragmentation cytoplasmique) étaient congelés par la technique de congélation lente ou par celle de vitrification.

1.3. Congélation embryonnaire par vitrification ou congélation lente

Deux protocoles de congélation lente en propanediol-sucrose ont été utilisés pour congeler les embryons précoces dans notre centre entre 2011 et 2014.

Concernant la congélation des embryons en 2011, le kit commercial Embryo Freezing Pack (Origio, Lyon, France) était utilisé. La congélation s'effectuait à température ambiante sous une hotte à flux laminaire. Les embryons étaient déposés successivement dans une solution d'EFM (Embryo Freezing Medium) pendant 5 minutes, puis dans une solution d'EFM + 1,2-propanediol (1,5M) pendant 10 minutes et enfin dans une solution d'EFM + 1,2-propanediol (1,5M) + sucrose (0,2M) pendant 15 minutes. Les embryons étaient ensuite montés dans des paillettes (un embryon par paillette) à embout cotonné (Cryobiosystem, CBS, France) selon le schéma présenté à la Figure 13. Chaque paillette était identifiée par le nom, le prénom et la date de naissance de la patiente ainsi que par une couleur de jonc et de visotube spécifique.

La congélation était effectuée à l'aide d'un appareil de congélation programmé (congélateur Minicool 40 PC) selon les vitesses de descente en température suivantes : de la température ambiante à 0°C le refroidissement était de -2°C/min, puis de 0°C à -7°C la vitesse de refroidissement était de -0,3°C/min. Le seeding manuel était ensuite réalisé en appliquant une barre métallique refroidie dans l'azote liquide sur la paillette au voisinage de l'embryon. Après un équilibre de 5 minutes, le refroidissement était repris à la vitesse de -0,3°C/min jusqu'à -35°C. Puis de -35°C à -150°C, la vitesse de refroidissement était accélérée à -50°C/min. Les paillettes étaient ensuite plongées directement dans l'azote liquide à -196°C et conservées dans des cuves d'azote au CECOS.

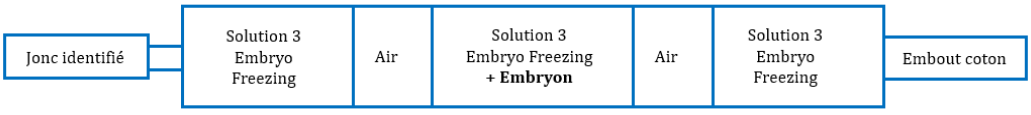


Figure 13 : Schéma du montage des embryons en paillette pour la congélation des embryons en 2011.

Concernant la congélation des embryons entre 2012 et fin 2014, les solutions 3 des kits Embryo Freezing Pack (Origio, Lyon, France) et Embryo Thawing Pack (Origio, Lyon, France) étaient utilisées.

Selon ce protocole, l'embryon était laissé 2 minutes à température ambiante dans du milieu de culture (Global® + HSA) avant sa congélation. Il était ensuite incubé pendant 10 minutes dans 100 µl de solution EFM + 1,2-propanediol (1,5M) + sucrose (0,2M) (solution 3 du kit Embryo Freezing Pack) puis monté dans une paillette à embout cotonné (Cryobiosystem, CBS, France) selon le schéma présenté à la Figure 14. Les paillettes étaient identifiées de la même manière que pour le protocole précédent et la congélation était réalisée à l'aide du congélateur Minicool programmé avec les mêmes vitesses de descente en température.

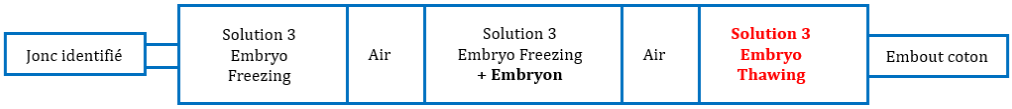


Figure 14 : Schéma du montage des embryons en paillette pour la congélation des embryons entre 2012 et 2014. La solution 3 du kit Embryo Thawing Pack (EFM + sucrose) est utilisée seulement pour le montage.

Le protocole de vitrification utilisait les milieux commerciaux de Irvine Scientific® (Irvine Scientific® Vitrification Freeze kit, Paris, France) contenant du DMSO, de l'Ethylène Glycol (EG) et du sucrose comme cryoprotecteurs. Les embryons étaient vitrifiés un par un ou deux par deux au maximum pour une paillette. Les différentes étapes de vitrification se déroulaient à température ambiante.

Après incubation pendant 8 minutes dans 50 µl de solution d'équilibration (ES) contenant 7,5 % de DMSO et 7,5 % d'EG ; les embryons étaient transférés dans 50 µl de solution de vitrification (VS) contenant 15 % de DMSO, 15 % d'EG et 0,5M de sucrose. Le passage dans la goutte de VS ne devait pas excéder 30 secondes. Les embryons étaient ensuite montés sur une paillette haute sécurité (HSV®, CryoBiosystem, L'Aigle, France) avec un volume très faible de milieu. La paillette était alors immédiatement soudée et plongée dans l'azote liquide à -196°C.

Les paillettes étaient conservées dans l'azote liquide dans une cuve au CECOS jusqu'au moment de leur utilisation pour un TEC.

1.4. Décongélation embryonnaire

La décongélation des embryons congelés par la méthode lente ne faisait pas appel à des kits commerciaux de décongélation mais s'effectuait en milieu de culture (Global® + HSA équilibré) à température ambiante et sous hotte à flux laminaire.

Pour les embryons congelés en 2011, les paillettes étaient retirées de l'azote liquide et réchauffées rapidement puis déconditionnées dans une goutte de 100 µl de Global® + HSA sous loupe binoculaire. Les embryons étaient ensuite rincés dans deux gouttes successives de Global® + HSA.

Pour les embryons congelés entre 2012 et fin 2014, le protocole de décongélation différait du précédent selon les points suivants :
Après le réchauffement de la paillette, celle-ci était agitée pendant une minute afin de mélanger les différentes solutions contenues dans la paillette (solution 3 du kit Embryo Freezing Pack et solution 3 du kit Embryo Thawing Pack). La paillette était ensuite déposée pendant 2 minutes à l'étuve sèche à 37°C puis 1 minute à température ambiante avant d'être déconditionnée dans 100 µl de Global® + HSA et laissée à incuber 5 minutes dans cette goutte.

Concernant le réchauffement des embryons vitrifiés, les paillettes étaient dévitrifiées une par une en utilisant les milieux commerciaux d'Irvine Scientific® (Irvine Scientific®, Vitrification Thaw kit, Paris, France). Les paillettes étaient déconditionnées dans l'azote liquide et la gouttière contenant les embryons était immédiatement placée pendant 1 minute à température ambiante dans une goutte de 250 µl de solution de décongélation (TS) (contenant 1M de sucrose) préalablement préparée et laissée à 37°C sans CO_2 pendant 30 minutes. Les embryons étaient ensuite incubés 4 minutes dans 50 µl d'une solution de dilution (DS) contenant 0,5M de sucrose puis dans deux gouttes successives de 50 µl de solution de rinçage (WS) pendant 4 minutes à température ambiante.

Quel que soit le protocole de décongélation utilisé, les embryons étaient ensuite placés dans du milieu de culture (Global® + HSA) et observés au grossissement x400 sur un microscope Nikon à contraste de phase afin d'évaluer la survie embryonnaire.
La survie embryonnaire était définie par la présence d'au moins 50 % des blastomères intacts après la décongélation. Les embryons étaient qualifiés de totalement intacts si

100 % des blastomères avaient survécu à la congélation/décongélation et donc qu'aucune lyse cellulaire n'était observée.
Seuls les embryons avec au moins 50 % des blastomères intacts étaient transférés.

Après leur observation, les embryons étaient laissés à 37°C sous 5,7 % de CO_2 dans du milieu Global® + HSA en attendant le moment du transfert.

1.5. Tentatives de transfert d'embryon(s) congelé(s) (TEC)

En vue du TEC, chaque patiente bénéficiait d'un traitement hormonal substitutif par l'administration d'œstrogènes associé à une surveillance échographique. Lorsqu'une épaisseur de l'endomètre acceptable (8 mm) était atteinte, un traitement par progestérone était ajouté par voie vaginale. Le transfert avait lieu le deuxième ou troisième jour de l'administration de progestérone selon le stade des embryons à transférer.

Les embryons étaient décongelés le jour du transfert et n'étaient pas sélectionnés, la décongélation des paillettes s'effectuant au hasard jusqu'à obtenir le nombre d'embryons transférables requis pour la tentative de TEC.

Les embryons étaient transférés dans la cavité utérine à l'aide d'un cathéter préalablement rincé avec du milieu de culture Global® + HSA (Elliocath, ElliosBioTek, Paris, France ou Frydman Memory, CCD, Paris, France). Le nombre d'embryons transférés par cycle de TEC variait de 1 à 3 dans les deux groupes.

Seules les tentatives de TEC où un transfert a pu être effectué ont été prises en compte dans l'étude afin de pouvoir comparer les issues cliniques des tentatives entre les deux groupes.

1.6. Expression des résultats

Le critère de jugement principal était le taux de naissance vivante par embryon décongelé.

Les critères de jugement secondaires étaient le taux de survie (pourcentage d'embryons ayant ≥ 50 % de blastomères intacts après décongélation), le taux de survie intact (pourcentage d'embryons ayant 100 % de blastomères intacts après décongélation), les taux de grossesse débutante (présence de β-hCG positives 14 jours après le TEC), de grossesse évolutive (grossesse intra-utérine au-delà de 12 semaines d'aménorrhée (SA)) et d'accouchement par transfert et le taux d'implantation (nombre de sacs embryonnaires avec activité cardiaque vus à l'échographie entre 6 et 8 SA sur le nombre d'embryons transférés).

1.7. Analyse statistique des données

Les données ont été recueillies sous Excel et analysées à l'aide du logiciel BiostaTGV en ligne.

Les différents paramètres ont été comparés entre les deux groupes à l'aide d'un test du Chi-2 ou d'un test exact de Fisher (lorsque les conditions du Chi-2 n'étaient pas remplies) pour les variables qualitatives et d'un test de Student pour les variables quantitatives.

Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme étant statistiquement significative.

2. Résultats

Caractéristiques des deux groupes

Au total, les 85 TEC analysés dans chaque groupe correspondaient respectivement à 67 et 71 tentatives en frais pour le groupe vitrification et congélation lente. La proportion de chaque technique de FIV utilisée est indiquée dans le tableau 2 et était identique dans les deux échantillons.

L'âge moyen des femmes au moment de la ponction n'était pas significativement différent entre les deux groupes (32,9 ± 4,9 ans pour le groupe vitrification et 32,9 ± 4,7 ans pour le groupe CL) ; de même pour l'âge des femmes au moment du TEC (33,2 ± 4,8 ans pour le groupe vitrification et 33,4± 4,6 ans pour le groupe CL).

Aucune différence statistiquement significative n'était observée entre les deux groupes concernant les indications des TEC (p=1), les rangs des tentatives en frais (p=0,92), le nombre d'ovocytes ponctionnés (p=0,43) et inséminés (p=0,35), le nombre d'embryons obtenus (p=0,30) et congelés (p=0,70) (Tableau 2).

Tentatives de TEC

153 embryons ont été transférés dans chacun des deux groupes. Ces embryons étaient obtenus à partir de la décongélation de 158 embryons pour le groupe vitrification et 232 embryons pour le groupe CL ; soit un taux de survie de 96,8 % après vitrification et de 65,9 % après CL (p=3,2 E-13) et une moyenne d'embryon décongelé par TEC de 1,9 ± 0,5 et 2,7 ± 1,2 pour chacun des groupes (p=8,4 E-9). De plus, le taux de survie intact était respectivement de 85,4 % et de 37,9 % après vitrification et CL (p=1,3 E-20) (Tableau 3).

Concernant les issues cliniques des TEC, 39 grossesses ont débuté dans le groupe vitrification et 20 dans le groupe CL ; conduisant à 25 et 11 grossesses évolutives puis à 23 et 11 accouchements (une interruption thérapeutique de grossesse et une fausse couche tardive ayant eu lieu dans le groupe vitrification) et enfin à la naissance de 27 et 12 enfants dans chacun des deux groupes (5 accouchements de jumeaux et 1 accouchement d'un enfant mort-né dans le groupe vitrification et 1 accouchement de jumeaux dans le groupe CL).

Des différences significatives étaient retrouvées entre les deux groupes, en faveur de la vitrification, concernant le taux de grossesse débutante (par transfert : 45,9 % vs 23,5 %), le taux d'implantation (21,6 % vs 12,4 %), le taux de grossesse évolutive (par transfert : 29,4 % vs 12,9 %), le taux d'accouchement (par transfert : 27,1 % vs 12,9 %) et le taux de naissance vivante (par embryon décongelé : 17,1 % vs 5,2 % et par embryon transféré : 17,6 % vs 7,8 %). Aucune différence significative n'était retrouvée concernant le taux de fausse couche entre les deux groupes (35,9 % vs 45 %) (Tableau 3).

Tentatives de TEC avec 100 % des embryons transférés intacts

Parmi les 85 TEC analysés, 71 dans le groupe vitrification et 35 dans le groupe congélation lente correspondaient à des tentatives où tous les embryons transférés étaient 100 % intacts après décongélation.

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le nombre moyen d'embryons transférés dans les deux groupes (1,8 ± 0,5 pour le groupe vitrification et 1,6 ± 0,5 pour le groupe CL).

Une différence significative était retrouvée, en faveur du groupe vitrification, en ce qui concerne les taux de grossesse débutante (p=0,03), de grossesse évolutive (p=0,003) et d'accouchement (p=0,007) par transfert. Le taux de naissance vivante par embryon transféré était également significativement supérieur dans le groupe vitrification par rapport au groupe CL (18,3 % vs 3,5 % ; p=0,007).

Aucune différence significative n'était mise en évidence entre les deux groupes concernant les taux d'implantation (p=0,09).

Le taux de fausse couche était significativement plus élevé dans le groupe congélation lente (77,8 % vs 35,3 % ; p=0,03) (Tableau 4).

Tableau 2 : Caractéristiques des groupes vitrification et congélation lente.
m±ds = moyenne ± déviation standard.

	Groupe vitrification	Groupe CL	*p*
Nombre de couples (n)	67	68	
Age des femmes à la ponction (m±ds)	32,9 ± 4,9	32,9 ± 4,7	*0,98*
Age des femmes lors du TEC (m±ds)	33,2 ± 4,8	33,4 ± 4,6	*0,77*
Nombre de tentatives en frais (n)	67	71	
FIV conventionnelle (%)	32,8	35,2	*0,77*
ICSI sperme frais (%)	50,7	46,5	*0,62*
ICSI sperme congelé (%)	6,0	7,0	*1*
ICSI – TESE (%)	10,4	11,3	*0,88*
Nombre de TEC (n)	85	85	
Indications des TEC (%)			
Idiopathique	29,4	29,4	*1*
OAT	21,2	21,2	*1*
Tubaire	14,1	14,1	*1*
Ovulatoire (dont SOPK)	11,8	11,8	*1*
Endométriose III-IV	7,1	7,1	*1*
Sperme congelé	7,1	7,1	*1*
TESE	9,4	9,4	*1*
Rangs des tentatives en frais (%)			
Rangs 1 et 2	91,0	91,5	*0,92*
Rangs 3 et 4	9,0	8,5	*0,92*
Nombre ovocytes ponctionnés (m±ds/tentative)	832 (12,4 ± 5,2)	830 (11,7 ± 5,5)	*0,43*
Nombre ovocytes inséminés (m±ds/tentative)	711 (10,6 ± 5,1)	699 (9,8 ± 4,5)	*0,35*
Nombre embryons obtenus (m±ds/tentative)	571 (8,5 ± 4,0)	558 (7,9 ± 3,5)	*0,30*
Nombre embryons congelés (m±ds/tentative)	270 (4,0 ± 2,7)	298 (4,2 ± 2,4)	*0,70*
≤ 5 embryons (%/tentative)	77,6	77,5	*0,98*
6-10 embryons (%/tentative)	19,4	19,7	*0,96*
>10 embryons (%/tentative)	3,0	2,8	*1*

Tableau 3 : Comparaison des données des TEC entre le groupe vitrification et CL.
m±ds = moyenne ± déviation standard. FCS = fausse couche spontanée avant 12 SA.
* = valeur statistiquement significative.

	Groupe vitrification	Groupe CL	*p*
Nombre de décongélations	85	85	
Nombre embryons décongelés (m±ds)	158 (1,9 ± 0,5)	232 (2,7 ± 1,2)	*8,4 E-9**
Nombre embryons transférés (m±ds)	153 (1,8 ± 0,5)	153 (1,8 ± 0,5)	*1,0*
Nombre embryons 100% intacts	135	88	
Taux survie (%)	**96,8**	**65,9**	***3,2 E-13****
Taux survie intact (%)	**85,4**	**37,9**	***1,3 E-20****
Grossesses débutantes (n)	*39*	*20*	
Taux d'implantation (%)	**21,6% (33/153)**	**12,4% (19/153)**	***0,03****
Grossesses évolutives (n)	*25*	*11*	
Accouchement (n)	*23*	*11*	
Naissances (n)	*27*	*12*	
Taux de naissance vivante / embryon décongelé (%)	**17,1**	**5,2**	***0,0001****
Taux de naissance vivante / embryon transféré (%)	**17,6**	**7,8**	***0,010****
Taux grossesse débutante / transfert (%)	**45,9**	**23,5**	***0,002****
Taux grossesse évolutive / transfert (%)	**29,4**	**12,9**	***0,009****
Taux d'accouchement / transfert (%)	**27,1**	**12,9**	***0,02****
Nombre FCS (%)	14 (35,9)	9 (45)	*0,50*

Tableau 4 : Comparaison des données des TEC où 100 % des embryons transférés étaient intacts entre le groupe vitrification et CL.

m±ds = moyenne ± déviation standard. FCS = fausse couche spontanée avant 12 SA.
* = valeur statistiquement significative.

	Groupe vitrification	Groupe CL	*p*
Nombre de transfert où tous les embryons transférés étaient 100% intacts	71	35	
Nombre embryons transférés (m±ds)	126 (1,8 ± 0,5)	57 (1,6 ± 0,5)	*0,16*
Grossesses débutantes (n)	*34*	*9*	
Taux d'implantation (%)	**23,5% (29/126)**	**12,3% (7/57)**	***0,09***
Grossesses évolutives (n)	*22*	*2*	
Accouchement (n)	*20*	*2*	
Naissances (n)	*23*	*2*	
Taux de naissance vivante / embryon transféré (%)	**18,3**	**3,5**	***0,007****
Taux grossesse débutante / transfert (%)	**47,9**	**25,7**	***0,03****
Taux grossesse évolutive / transfert (%)	**31,0**	**5,7**	***0,003****
Taux d'accouchement / transfert (%)	**28,2**	**5,7**	***0,007****
Nombre FCS (%)	12 (35,3)	7 (77,8)	*0,03**

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré une supériorité de la vitrification, dans notre centre, sur l'ensemble des paramètres étudiés. Nous avons principalement retrouvé un taux de naissance vivante par embryon décongelé plus élevé après vitrification en comparaison à la congélation lente.

Survie embryonnaire

Les embryons vitrifiés au stade précoce résistaient significativement mieux au processus de congélation/décongélation que ceux congelés par la méthode lente (avec un taux de survie de 96,8 % vs 65,9 % ; p=3,2 E-13 et un taux de survie intact de 85,4 % vs 37,9 % ; p=1,3 E-20).

Nos résultats sont conformes à ceux publiés dans la littérature à ce sujet. Les méta-analyses de Loutradi *et al*., en 2008, et d'AbdelHafez *et al*., en 2010, montraient la supériorité de la vitrification sur la congélation lente pour la survie embryonnaire (4,7). L'étude randomisée de Debrock *et al.,* en 2015, retrouvait un taux de survie et de survie intact des embryons clivés précoces supérieurs après vitrification comparativement à la congélation lente (84,3 % vs 52,5 % et 75,4 % vs 28,6 %) (72). De même pour Balaban *et al.* qui montraient des taux de survie et de survie intact significativement plus élevés après vitrification (94,8 % vs 88,7 % et 77,9 % vs 51,4 %) (71) ou pour Rezazadeh *et al.* (96,9 % vs 82,8 % et 91,8 % vs 56,2 %) (75).

Nous avons fait le choix de comparer seulement les tentatives de TEC pour lesquelles un transfert embryonnaire avait eu lieu. En effet, les données de la littérature sur la survie embryonnaire étant connues et en faveur de la vitrification, nous avons choisi d'évaluer les deux méthodes de congélation sur les données cliniques.

Nous avons, néanmoins, comparé également les taux de transfert par cycle de décongélation initié après vitrification ou congélation lente d'embryons au stade J2-J3 dans notre centre. Sur l'année 2015, 118 cycles de décongélation après vitrification ont été initiés et ont conduit à 117 TEC. Entre 2011 et 2014, 436 cycles de décongélation après congélation lente ont été réalisés et ont conduit à 376 TEC. Une différence significative était retrouvée entre les deux groupes concernant les taux de transfert par

cycle de décongélation initié (99,2 % vs 86,2 % ; p=7,0 E-5). Il faut noter que le nombre moyen d'embryons transférés par TEC était similaire dans les deux groupes (Annexe 1).
Ces données, concordantes avec celles de la littérature (73,79), renforcent les résultats de notre étude montrant la supériorité de la vitrification sur la congélation lente en ce qui concerne le taux de survie embryonnaire.

Issues cliniques

Concernant les issues cliniques, nous avons observé une différence significative, en faveur de la vitrification, pour les taux de grossesse débutante, évolutive et le taux d'accouchement par transfert lorsque comparés aux résultats de la congélation lente (respectivement p=0,002 ; p=0,009 et p=0,02). De même, une différence hautement significative était retrouvée, en faveur de la vitrification, concernant le taux de naissance vivante par embryon décongelé avec un taux de 17,1 % après vitrification versus 5,2 % après congélation lente (p=0,0001).

A notre connaissance, une seule étude randomisée a montré la supériorité de la vitrification sur la congélation lente des embryons clivés précoces en utilisant le taux de naissance vivante par embryon décongelé (72). Leurs résultats étaient similaires aux nôtres avec un taux de naissance vivante par embryon décongelé de 16,1 % après vitrification et 5,0 % après congélation lente.

L'expression des résultats en taux de naissance vivante par embryon décongelé nous parait être le meilleur critère pour évaluer et comparer les deux méthodes de congélation. En effet, ce critère, correspondant à la probabilité qu'un embryon décongelé donne un enfant, permet de prendre en compte le taux de lyse embryonnaire et de considérer l'éventuelle perte de chance liée à la congélation (80).

D'autres études ont utilisé comme critères d'évaluation le taux de grossesse clinique par cycle de décongélation ou par transfert et retrouvaient une supériorité significative de la vitrification pour les embryons clivés précoces. Sifer *et al*. rapportaient un taux de grossesse clinique par cycle de décongélation de 32,7 % après vitrification et 18,5 % après congélation lente (81) ; Levron *et al*. décrivaient un taux de grossesse clinique par transfert de 20 % après vitrification et de 11,9 % après congélation lente (79) ; de même

pour Rezazadeh *et al*. (40,5 % vs 21,4 % pour le taux de grossesse clinique par transfert après vitrification et congélation lente) (75).

De plus, dans notre étude, le taux d'accouchement par transfert était significativement plus élevé dans le groupe vitrification (27,1 %) par rapport au groupe congélation lente (12,9 %). La vitrification a donc amélioré nos résultats en TEC et permet d'atteindre des résultats proches de ceux obtenus après un transfert frais (le taux d'accouchement par transfert frais d'embryons J2-J3 en 2015 était de 30,5 % et de 29 % en 2014).

Nous pouvons remarquer que l'analyse des tentatives de TEC où tous les embryons transférés étaient 100 % intacts, montre également une différence significative, en faveur de la vitrification, concernant les données cliniques entre les deux groupes. Ce résultat est à rapporter, notamment, au taux de fausse couche qui apparait significativement plus élevé dans le groupe congélation lente (77,8 % vs 35,3 % ; p=0,03).

Profil de l'étude

Nous avons fait le choix d'exclure de cette étude toutes les tentatives de TEC de 2015 pour lesquelles la vitrification avait été réalisée en 2014 afin d'éliminer les premières tentatives. En effet, il existe une période d'apprentissage incompressible à l'instauration de la technique de vitrification dans un centre d'AMP (57,82). Dans notre centre, le taux d'accouchement par décongélation après vitrification est passé, par exemple, de 5 % sur les premiers essais en 2014 à 16,3 % sur les six premiers mois de 2015, puis à 32 % pour le second semestre 2015.

Parmi les critères d'appariement, nous avons tenu compte du nombre d'embryons congelés lors de la tentative en frais en définissant des classes : ≤5 ; de 6 à 10 et >10 embryons congelés. En effet, ce paramètre est un des plus importants pour le pronostic et influence les taux de succès (par exemple, en 2015, le taux d'accouchement par ponction, dans notre centre, variait de 18 % à 34 % selon si une congélation avait eu lieu ou pas lors de la tentative).

Limites de l'étude

Cette étude présente les limitations de toute étude rétrospective, cependant un appariement sur un grand nombre de critères a pu été réalisé permettant de limiter au maximum les biais de confusion.

De plus, les résultats rapportés après congélation lente couvraient une période différente et plus vaste qu'en vitrification, Pour limiter ce biais, nous avons sélectionné les tentatives témoins uniquement entre 2011 et 2014, période la plus récente pendant laquelle la congélation lente était la mieux maîtrisée.

4. Conclusion

Nous avons montré dans cette étude que la vitrification embryonnaire, telle que nous l'utilisons, a considérablement amélioré nos résultats en TEC avec des taux de survie excellents mais aussi de meilleurs taux de grossesse et de naissance vivante.
Après une courbe d'apprentissage, la vitrification permet aujourd'hui d'avoir des résultats voisins de ceux obtenus en transfert frais. Ce constat devrait modifier les pratiques de notre centre en diminuant le nombre d'embryons transférés en frais (favorisant la pratique du eSET), en augmentant le nombre d'embryons congelés et donc de TEC et ainsi le taux de grossesse cumulé.

D'autres études prospectives randomisées sont nécessaires pour identifier la meilleure méthode de cryopréservation des embryons au stade clivé précoce basée sur les taux de survie après décongélation, mais aussi sur l'efficacité clinique mise en évidence par le taux de naissance vivante et exprimée par embryon décongelé.

BIBLIOGRAPHIE

1. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature. 1983 Oct 20;305(5936):707–9.

2. Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril. 1984 Aug;42(2):293–6.

3. Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O, Saussereau MH, Cadoret V, et al. Single Day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. Hum Reprod Oxf Engl. 2009 May;24(5):1051–8.

4. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2008 Jul;90(1):186–93.

5. Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U. Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryos. Hum Reprod Oxf Engl. 1991 May;6(5):735–6.

6. Gordts S, Roziers P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. Fertil Steril. 1990 Mar;53(3):469–72.

7. AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online. 2010 Feb;20(2):209–22.

8. Wennerholm U-B, Söderström-Anttila V, Bergh C, Aittomäki K, Hazekamp J, Nygren K-G, et al. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. Hum Reprod Oxf Engl. 2009 Sep;24(9):2158–72.

9. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod Oxf Engl. 2010 Aug;25(8):1851–62.

10. Min JK, Hughes E, Young D, Gysler M, Hemmings R, Cheung AP, et al. Elective single embryo transfer following in vitro fertilization. J Obstet Gynaecol Can JOGC J Obstétrique Gynécologie Can JOGC. 2010 Apr;32(4):363–77.

11. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod Oxf Engl. 2011 Jun;26(6):1270–83.

12. Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst Rev. 2012;(7):CD002118.

13. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Oxf Engl. 2008 Jan;23(1):91–9.

14. Agence de la biomédecine - rapport médical et scientifique 2013.

15. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials. 1996 Feb;17(3):243–56.

16. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. Transfusion (Paris). 2007 May;47(5):935–45.

17. Gosden RG, Yin H, Bodine RJ, Morris GJ. Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy. Hum Reprod Oxf Engl. 2010 Feb;25(2):470–8.

18. Ashwood-Smith MJ. The cryopreservation of human embryos. Hum Reprod Oxf Engl. 1986 Aug;1(5):319–32.

19. Lansac J, Guérif F. AMP : L'assistance médicale à la procréation en pratique. Edited by Masson. 2005.

20. Baudot A, Mazuer J, Odin J. Conserver des éléments biologiques par vitrification : Applications particulières du froid. Rev Générale Froid. 1998;88 :35–40.

21. Morris GJ, Goodrich M, Acton E, Fonseca F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. Cryobiology. 2006 Jun;52(3):323–34.

22. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. Theriogenology. 2006 Jan 7;65(1):236–44.

23. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. Biol Reprod. 2008 Jan;78(1):2–12.

24. Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J Equine Vet Sci. 1987 Jan 1;7(3):145–73.

25. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2007;368:39–57.

26. Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, Appleton TC, Ashorn R. Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. Hum Reprod Oxf Engl. 1988 Aug;3(6):795–802.

27. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. Cryobiology. 1971 Oct;8(5):489–500.

28. Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochim Biophys Acta. 1953 May;11(1):28–36.

29. Lovelock JE. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957 Dec 17;147(929):427–33.

30. Meryman HT, Williams RJ, Douglas MS. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. Cryobiology. 1977 Jun;14(3):287–302.

31. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 1977 Jun;14(3):251–72.

32. Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. Hum Reprod Update. 2003 Dec;9(6):583–605.

33. Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. Hum Reprod Oxf Engl. 2002 Oct;17(10):2686–93.

34. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol Reprod. 2000 Mar;62(3):564–70.

35. Tharasanit T, Colenbrander B, Stout T a. E. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. Reprod Camb Engl. 2005 Jun;129(6):789–98.

36. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J Gen Physiol. 1963 Nov;47:347–69.

37. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. Cryo Letters. 2004 Dec;25(6):375–88.

38. Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell Tissue Bank. 2008 Dec;9(4):267–77.

39. Leibo SP, Pool TB. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. Fertil Steril. 2011 Aug;96(2):269–76.

40. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. Cryobiology. 1986 Feb;23(1):1–13.

41. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. Science. 1972 Oct 27;178(4059):411–4.

42. Whittingham DG. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. Ciba Found Symp. 1977 Jan 18;(52):97–127.

43. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reprod Camb Engl. 2011 Jan;141(1):1–19.

44. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science. 1970 May 22;168(3934):939–49.

45. Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. J Vitro Fertil Embryo Transf IVF. 1985 Jun;2(2):59–64.

46. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. Fertil Steril. 1985 Nov;44(5):645–51.

47. Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. Hum Reprod Update. 2012 Oct;18(5):536–54.

48. Liebermann J. Vitrification of Oocytes and Embryos. In: Katkov I, editor. Current Frontiers in Cryobiology. InTech. 2012; 169-84.

49. Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. Reprod Biomed Online. 2004 Aug;9(2):164–70.

50. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. Hum Reprod Oxf Engl. 2003 Feb;18(2):384–91.

51. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. Cryobiology. 2000 Mar;40(2):110–6.

52. Camus A, Clairaz P, Ersham A, Van Kappel A-L, Savić G, Staub C. [The comparison of the process of five different vitrification devices]. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2006 Sep;34(9):737–45.

53. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reprod Biomed Online. 2005 Nov;11(5):608–14.

54. Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. Reprod Biomed Online. 2015 Apr;30(4):325–33.

55. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. Reprod Biomed Online. 2006 Jun;12(6):779–96.

56. Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. Fertil Steril. 2006 Jul;86(1):20–6.

57. Dessolle L, Biau DJ, de Larouzière V, Ravel C, Antoine J-M, Daraï E, et al. Learning curve of vitrification assessed by cumulative summation test for learning curve (LC-CUSUM). Fertil Steril. 2009 Sep;92(3):943–5.

58. Oehninger S, Mayer J, Muasher S. Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo cryopreservation. Mol Cell Endocrinol. 2000 Nov 27;169(1–2):73–7.

59. Wang JX, Yap YY, Matthews CD. Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception. Hum Reprod Oxf Engl. 2001 Nov;16(11):2316–9.

60. Salumets A, Suikkari A-M, Mäkinen S, Karro H, Roos A, Tuuri T. Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome. Hum Reprod Oxf Engl. 2006 Sep;21(9):2368–74.

61. Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. Hum Reprod Oxf Engl. 2000 Jan;15(1):175–9.

62. Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation. Hum Reprod Oxf Engl. 1997 Sep;12(9):2006–10.

63. Zhang S, Lu C, Lin G, Gong F, Lu G. The number of blastomeres in post-thawing embryos affects the rates of pregnancy and delivery in freeze-embryo-transfer cycles. J Assist Reprod Genet. 2009 Dec;26(11–12):569–73.

64. El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, Andritsos V, Taylor A, Braude P. Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. Fertil Steril. 2003 May;79(5):1106–11.

65. Check JH, Swenson K, Yuan W, Nazari A. Effect of the degree of fragmentation on embryo survival after freeze-thawing. Clin Exp Obstet Gynecol. 2009;36(4):216.

66. Ziebe S, Bech B, Petersen K, Mikkelsen AL, Gabrielsen A, Andersen AN. Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer. Hum Reprod Oxf Engl. 1998 Jan;13(1):178–81.

67. Guerif F, Bidault R, Cadoret V, Couet M-L, Lansac J, Royere D. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. Hum Reprod Oxf Engl. 2002 May;17(5):1321–6.

68. Urman B, Balaban B, Yakin K. Impact of fresh-cycle variables on the implantation potential of cryopreserved-thawed human embryos. Fertil Steril. 2007 Feb;87(2):310–5.

69. Lin YP, Cassidenti DL, Chacon RR, Soubra SS, Rosen GF, Yee B. Successful implantation of frozen sibling embryos is influenced by the outcome of the cycle from which they were derived. Fertil Steril. 1995 Feb;63(2):262–7.

70. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? Curr Opin Obstet Gynecol. 2009 Jun;21(3):270–4.

71. Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. Hum Reprod Oxf Engl. 2008 Sep;23(9):1976–82.

72. Debrock S, Peeraer K, Fernandez Gallardo E, De Neubourg D, Spiessens C, D'Hooghe TM. Vitrification of cleavage stage day 3 embryos results in higher live birth rates than conventional slow freezing: a RCT. Hum Reprod Oxf Engl. 2015 Aug;30(8):1820–30.

73. Fasano G, Fontenelle N, Vannin A-S, Biramane J, Devreker F, Englert Y, et al. A randomized controlled trial comparing two vitrification methods versus slow-freezing for cryopreservation of human cleavage stage embryos. J Assist Reprod Genet. 2014 Feb;31(2):241–7.

74. Rama Raju GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K. Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. Reprod Biomed Online. 2005 Oct;11(4):434–7.

75. Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. J Assist Reprod Genet. 2009 Jun;26(6):347–54.

76. Li Y, Chen Z, Yang H, Zhong W, Ma S, Li M. [Comparison of vitrification and slow-freezing of human day 3 cleavage stage embryos: post-vitrification development and pregnancy outcomes]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2007 Nov;42(11):753–5.

77. Wilding MG, Capobianco C, Montanaro N, Kabili G, Di Matteo L, Fusco E, et al. Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction. J Assist Reprod Genet. 2010 Sep;27(9–10):549–54.

78. Son W-Y, Tan SL. Comparison between slow freezing and vitrification for human embryos. Expert Rev Med Devices. 2009 Jan;6(1):1–7.

79. Levron J, Leibovitz O, Brengauz M, Gitman H, Yerushalmi GM, Katorza E, et al. Cryopreservation of day 2-3 embryos by vitrification yields better outcome than slow freezing. Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol. 2014 Mar;30(3):202–4.

80. Prades M, Golmard J-L, Schubert B, Poirot C. Embryo cryopreservation: proposal for a new indicator of efficiency. Fertil Steril. 2011 Feb;95(2):577-582-2.

81. Sifer C, Sermondade N, Dupont C, Poncelet C, Cédrin-Durnerin I, Hugues J-N, et al. [Outcome of embryo vitrification compared to slow freezing process at early cleavage stages. Report of the first French birth]. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2012 Mar;40(3):158–61.

82. Hesters L, Achour-Frydman N, Mandelbaum J, Levy R. [Embryo vitrification: French clinical practice analysis for BLEFCO]. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2013 Sep;41(9):554–7.

ANNEXE 1

Annexe 1 : Taux de transfert par cycle de décongélation initié après vitrification ou congélation lente d'embryons précoces.

	Groupe vitrification (2015)	Groupe CL (2011-2014)	*p*
Cycles de décongélation initiés (n)	118	436	
Cycles de TEC (n)	117	376	
Taux de transfert par cycle de décongélation initié (%)	99,2	86,2	*7,0 E-5**
Nombre moyen d'embryons transférés (m±ds)	1,8 ± 0,5 (212/117)	1,8 ± 0,6 (694/376)	*0,58*

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.