



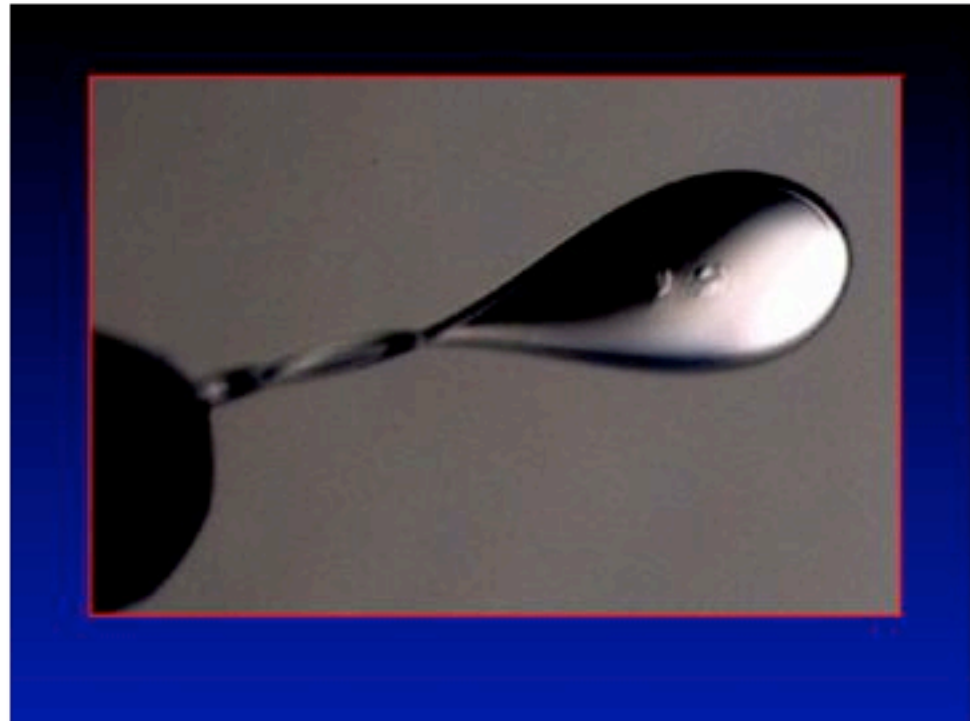
Cryoconservation des zygotes par vitrification

Alain Chanson

Laboratoire de Biologie
de la Reproduction (LBR)

Centre de Procréation
Médicalement Assistée
(CPMA)

Lausanne, Suisse



Certification
ISO 9001 : 2000
SQS 22544



Accréditation
ISO/IEC 17025 : 2005
STS 458

Les Chevreuils, le 18 juin 2009



Cryoconservation de zygotes humains par vitrification

- Etude prospective randomisée
- Comparaison de deux méthodes de cryoconservation de zygotes:
 - Le protocole classique de **congélation lente** du LBR
 - Un nouveau protocole de **vitrification** ultra rapide basé sur les produits commercialisés par Vitrolife
 - RapidVit™ Cleave
 - RapidWarm™ Cleave
- Cette étude a été acceptée par la commission d'éthique de la FBM de l'UNIL



Définition de la cryoconservation

- La **cryoconservation** est la conservation de cellules vivantes à très basses températures (stockage dans de l'azote liquide à -196°C)
- En Suisse, seule la **cryoconservation** des zygotes (ovocytes imprégnés) est autorisée par la LPMA
 - http://www.admin.ch/ch/f/rs/c810_11.html
- La durée de **cryoconservation** des zygotes est limitée à 5 ans



Principe de la cryoconservation

- Eviter la formation de **cristaux de glace** dans la cellule pour ne pas endommager les structures intracellulaires et la membrane
- Pour cela, la cellule doit subir une **déshydratation** relativement rapide qui est fonction de la vitesse de refroidissement
- L'utilisation de **cryoprotecteurs** (Ficoll, saccharose, propanediol, éthylène glycol) limite largement la formation de cristaux de glace dans les cellules



Principe de la vitrification

- La **vitrification** est un processus par lequel un liquide se solidifie sans former de cristaux de glace pouvant endommager les cellules vivantes
- Cette technique de cryoconservation consiste à exposer pour de courtes durées les cellules à des concentrations élevées de **cryoprotecteurs**, puis à les refroidir ultra rapidement, ce qui provoque une augmentation de la viscosité favorisant la formation d'un état "vitreux" intra- et extracellulaire



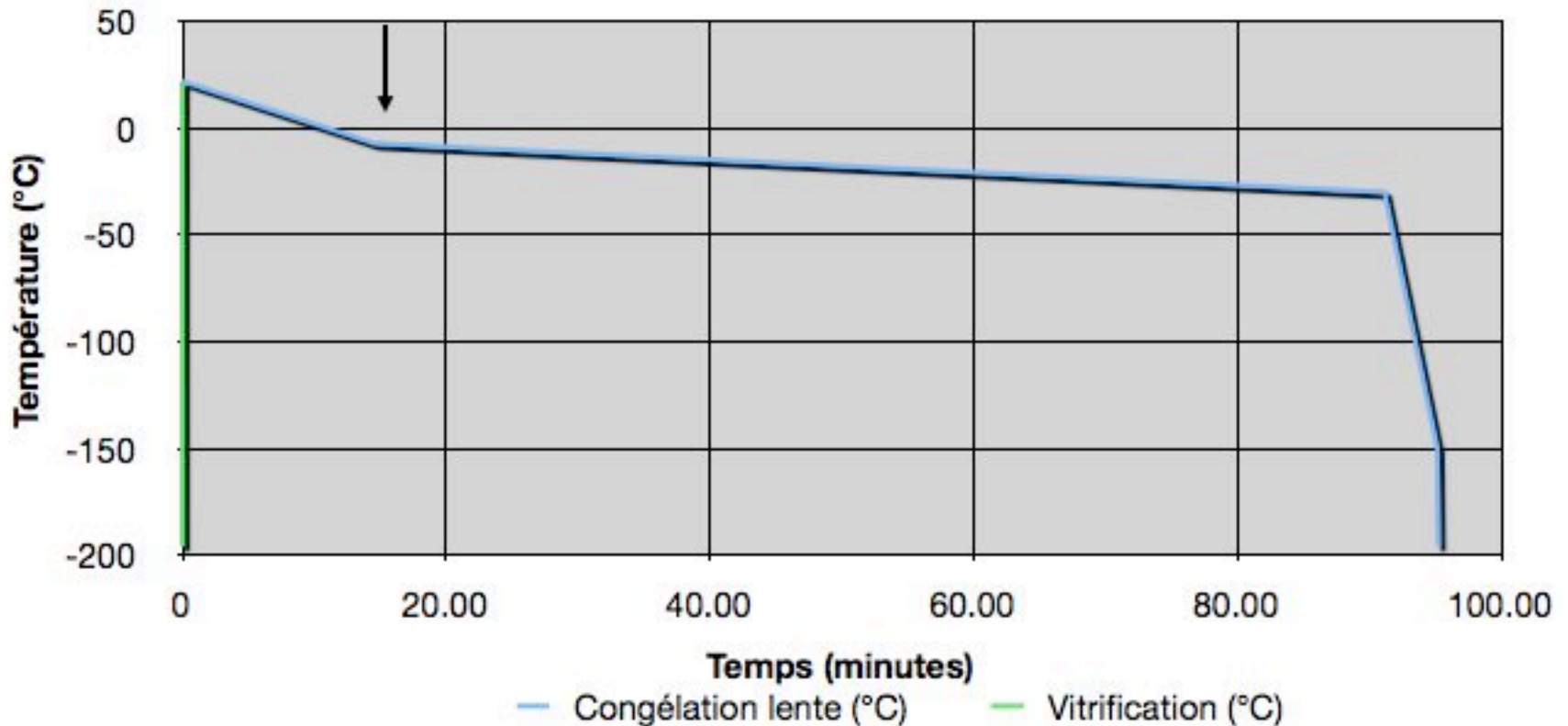
Comparaison des deux techniques

	Congélation lente	Vitrification
Concentration des cryoprotecteurs	Basse	Elevée
Période d'incubation en présence des cryoprotecteurs	Longue 15 - 20 minutes	Courte 30 secondes
Vitesse de cryoconservation	Lente 95 minutes	Ultra rapide ~1 seconde
Vitesse de décongélation ou de réchauffement	Rapide 50 secondes	Ultra rapide ~1 seconde
Elimination des cryoprotecteurs	Lente 15 minutes	Rapide 3.5 minutes



Courbes de température

“Seeding” manuel





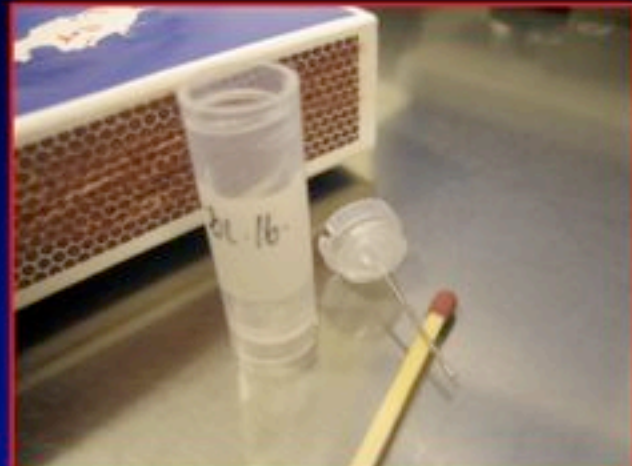
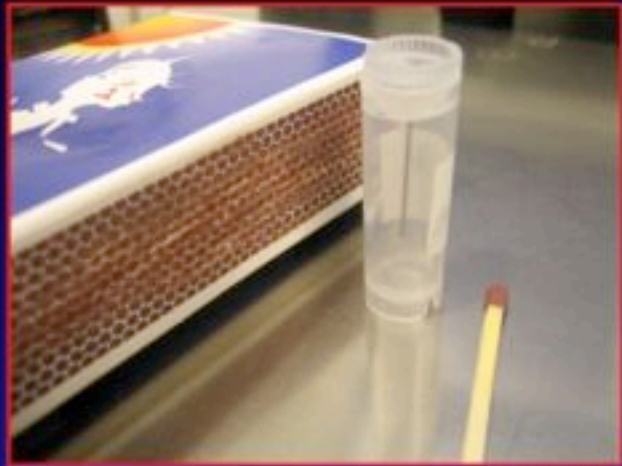
Congélation lente





Vitrification

Vitroloop™ de Vitrolife





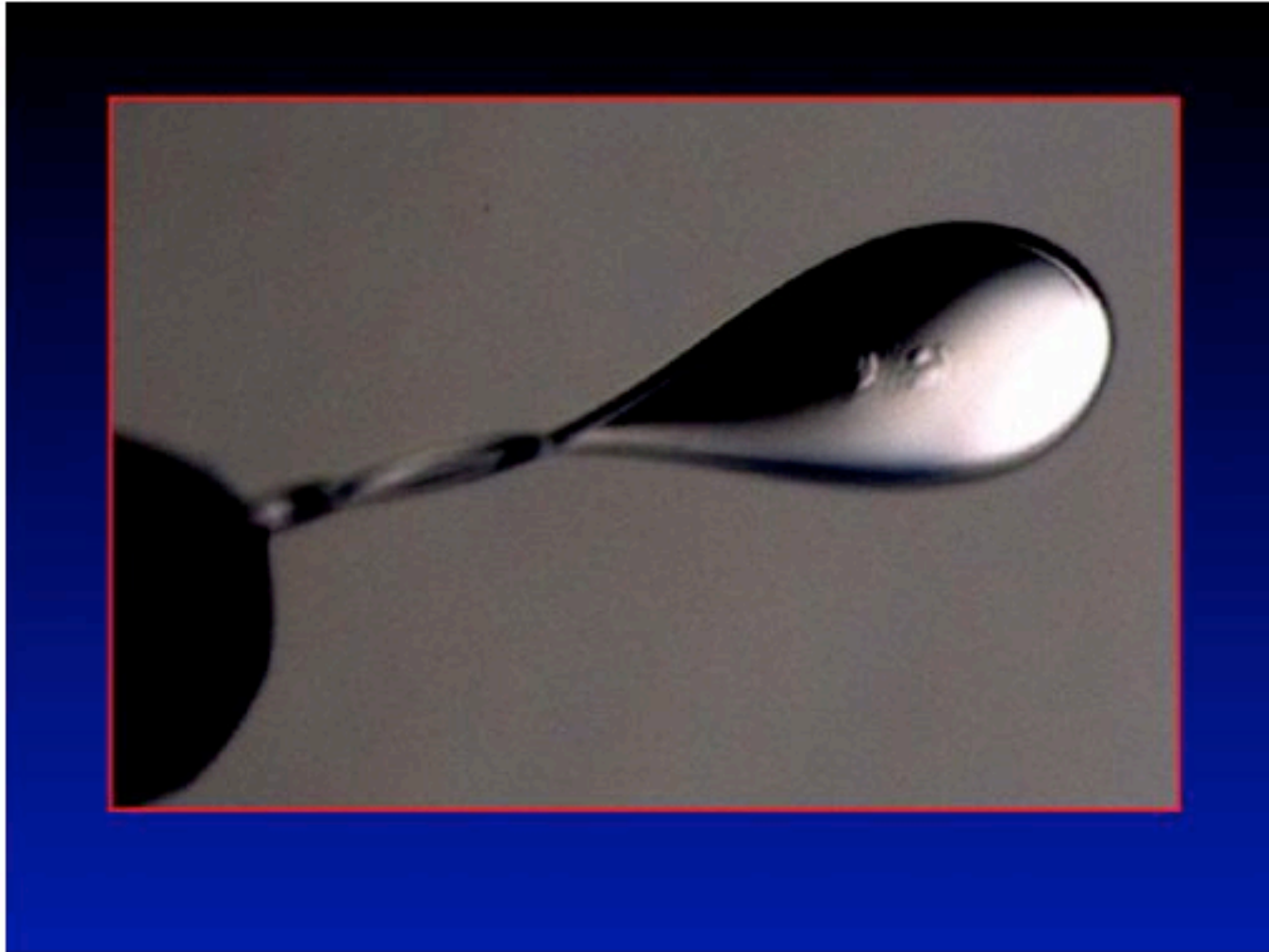
Anneau en nylon



Les Chevreuils, le 18 juin 2009



Embryons sur un film de milieu



Les Chevreuils, le 18 juin 2009



Critères d'inclusion

- Patientes suivies entièrement par le CPMA, qui doivent effectuer un cycle de fécondation in vitro et transfert d'embryons (FIVETE) avec ou sans injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI)
- Récolte de moins de 20 ovocytes lors de la ponction
- 10 ovocytes imprégnés (zygotes) ou plus obtenus par FIV ou par ICSI
- Couple acceptant de vitrifier 2 zygotes, tous les autres étant cryoconservés par congélation lente
- Couple acceptant de ne transférer qu'un seul embryon si l'un des zygote vitrifié ou cryoconservé par la méthode habituelle se lyse lors de la période de réchauffement



Critères d'exclusion

- ICSI avec moins de 0.1 millions de spermatozoïdes mobiles après lavage (ou avec une biopsie testiculaire), afin de réduire les influences possibles liées une mauvaise qualité du sperme
- Patientes refusant de ne transférer qu'un seul embryon si un zygote se lyse
- Patiente ne comprenant pas les modalités de l'étude



Résultats du centre de PMA de l'Université de Lübeck (Allemagne)

Vitrification

- Vitrification de 849 zygotes entre 2004 et 2006
- 103 cycles de décongélation
- Réchauffement de 339 zygotes
- Taux de survie de 89% (302 zygotes)
- Transfert de 2.3 embryons en moyenne
- Taux de grossesse clinique par transfert de **28.2%**

Al-Hasani et al. (2007) *Reprod Biomed Online*, 14, 288-293



Résultats du centre de PMA de l'Université de Lübeck (Allemagne)

Congélation lente

- Cryoconservation de 2'792 zygotes entre 1994 et 1998
- 412 cycles de décongélation avec transfert
- Transfert de 2.5 embryons en moyenne
- Taux de grossesse clinique par transfert de **10.2%**

Schröder et al. (2002) *Reprod Biomed Online*, 6, 69-74



Résultats du CPMA en 2008

Congélation lente

- Décongélation de 1'576 zygotes
- Taux de survie de 84.5% (1332 zygotes)
- 645 cycles de décongélation avec transfert
- Transfert de 1.8 embryons en moyenne
- Taux de grossesse clinique par transfert de **23.0%**

Rapport annuel 2008 du LBR



Protocole de vitrification

- Placer 0.5 à 1 ml des solutions suivantes dans 3 puits de boîte de culture Nunc et chauffer à 37°C
 - Vitri 1™ Cleave (Puits 1)
 - Vitri 2™ Cleave (Puits 2)
 - Vitri 3™ Cleave (Puits 3)
- Toutes les manipulations des zygotes sont effectuées à 37°C
- Transférer les zygotes à vitrifier dans le milieu Vitri 1™ Cleave et les laisser au moins 5 min, mais pas plus de 10 minutes
- Transférer les zygotes dans le milieu Vitri 2™ Cleave et les laisser 2 minutes
- Préparer la Vitroloop
- Lorsqu'il reste 30 secondes, préparer une goutte d'environ 20 µl de Vitri 3™ Cleave dans une boîte de Pétri de 35 mm



- Lorsqu'il reste 10 secondes, préparer le transfert des zygotes en utilisant un volume minimum de Vitri 2™ Cleave
- Transférer les zygotes dans la goutte de Vitri 3™ Cleave
- Déplacer les zygotes 2 - 3 fois dans la goutte pour bien les imprégner de milieu
- Les zygotes doivent rester au maximum 30 secondes dans ce milieu
- Lorsqu'il reste 5 - 10 secondes, transférer les zygotes sur la Vitroloop
- Vitrifier immédiatement les zygotes en plongeant la Vitroloop dans l'azote liquide
- Maintenir le cryotube dans l'azote liquide avec la pince Hampton
- Visser délicatement le bouchon de la Vitroloop
- Placer le tube sur un support en aluminium et stocker à -196°C



Protocole de réchauffement

- Placer 0.5 à 1 ml des solutions suivantes dans 4 puits de boîte de culture Nunc et chauffer à 37°C
 - Warm 1™ Cleave (Puits 1)
 - Warm 2™ Cleave (Puits 2)
 - Warm 3™ Cleave (Puits 3)
 - Warm 4™ Cleave (Puits 4)
- Toutes les manipulations des zygotes sont effectuées à 37°C
- En restant dans l'azote liquide, enlever le cryotube du support en aluminium en utilisant la pince Hampton
- Dévisser délicatement le bouchon de la Vitroloop
- Placer très rapidement l'anneau en nylon de la Vitroloop dans le Warm 1™ Cleave (Puits 1)
- Laisser les zygotes tomber au fond du puits et attendre 10 - 30 secondes



- Transférer les zygotes dans le Warm 2™ Cleave (Puits 2) et attendre 60 secondes
- Transférer les zygotes dans le Warm 3™ Cleave (Puits 3) et attendre 120 secondes
- Transférer les zygotes dans le Warm 4™ Cleave (Puits 4) et attendre 5 minutes
- Rincer plusieurs fois les zygotes dans du milieu de culture avant de les mettre à l'incubateur



Avantages de la vitrification

- Pas besoin d'un coûteux système de congélation (minicool 40 PC)
- Protocole rapide
- Possibilité de vitrifier des ovocytes en urgence
- Possibilité de vitrifier des blastocystes en urgence
- Possibilité de vitrifier des zygotes en urgence (pannes du système de congélation)
- Utilisation de très peu d'azote liquide



Inconvénients de la vitrification

- Milieux de vitrification et de réchauffement coûteux (Vitrolife)
- Seul un petit nombre de zygotes (1 - 4) peut être vitrifié en même temps
- La procédure doit être répétée plusieurs fois si le nombre de zygotes est plus important (5 - 12)
- La technique de vitrification est beaucoup moins efficace que la congélation lente lors de la cryoconservation simultanée d'un grand nombre de zygotes (13 - 50)
- Les cryotubes sont plus difficile à stocker que les paillettes utilisées pour la congélation lente



Références

- Introducing ultra rapid vitrification (Brochure Vitrolife)
- Vitrolife introduces Rapid Vitrification (Brochure Vitrolife)
- RapidVit™ Cleave
 - <http://www.vitrolife.com/fertility/index.cfm?page=0E5DBA93-0E6C-A8DB-7FA07C53C353BC94>
- RapidWarm™ Cleave
 - <http://www.vitrolife.com/fertility/index.cfm?page=0E7592D3-0181-D85B-74CB128973DC82F1>
- Article de revue en français
 - Vanderzwalmen et al. (2006), Gynécologie Obstétrique & Fertilité 34, 760-769