



Congélation lente ou vitrification en AMP: Que choisir ?

J. Mandelbaum-Bleibtreu, V. de Larouzière, I. Berthaut, C. Ravel, F. Beaudelot, E. Mathieu, L. Verstraete, JM. Antoine

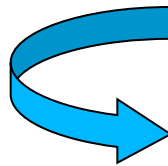
**Service d'Histologie, Biologie de la Reproduction/ CECOS
Hôpital TENON**

Hôpital Américain 2011



Le but: la cryoconservation des gamètes et des embryons

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans



2 grandes approches possibles



Congélation lente Vitrification

- La cryoconservation doit permettre le ralentissement, voire l'arrêt réversible de tous les phénomènes biologiques
- A des températures $< -150^{\circ}\text{C}$, les mouvements moléculaires sont très réduits, les réactions enzymatiques inhibées: « le temps cellulaire est suspendu »... « la vie latente »
- L'EAU constituant majeur des cellules, liquide \longrightarrow solide
- Le problème sera d'atteindre et de revenir de ces basses températures sans dommages en récupérant un état liquide viable

La congélation lente s'accompagne d'une cristallisation





On navigue entre 2 écueils

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

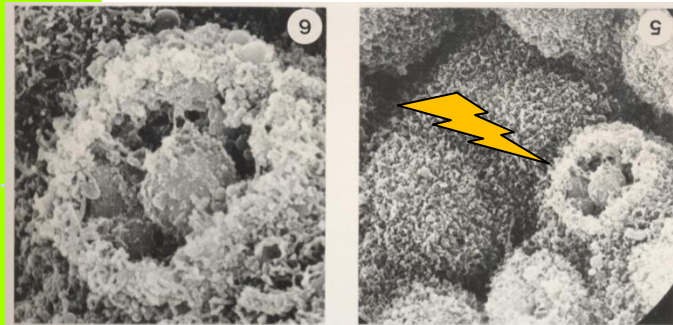
La glace intracellulaire et extracellulaire:

- lésions mécaniques par son volume et la formation de cristaux

La déshydratation:

- *effet osmotique* → « **effet de solution** », qui peut entraîner une modification de la structure tertiaire et du fonctionnement des protéines, une dénaturation des phospholipides membranaires et la mort cellulaire

• *Effet mécanique:* la cellule se contracte... si on descend en dessous de 20% du volume d'eau initial → **lésions irréversibles du cytosquelette et perte de viabilité**



Blastocyste bovin après décongélation

2 solutions: les cryoprotecteurs
et le contrôle des vitesses de
refroidissement
et de réchauffement

Les 2 grandes techniques de cryoconservation

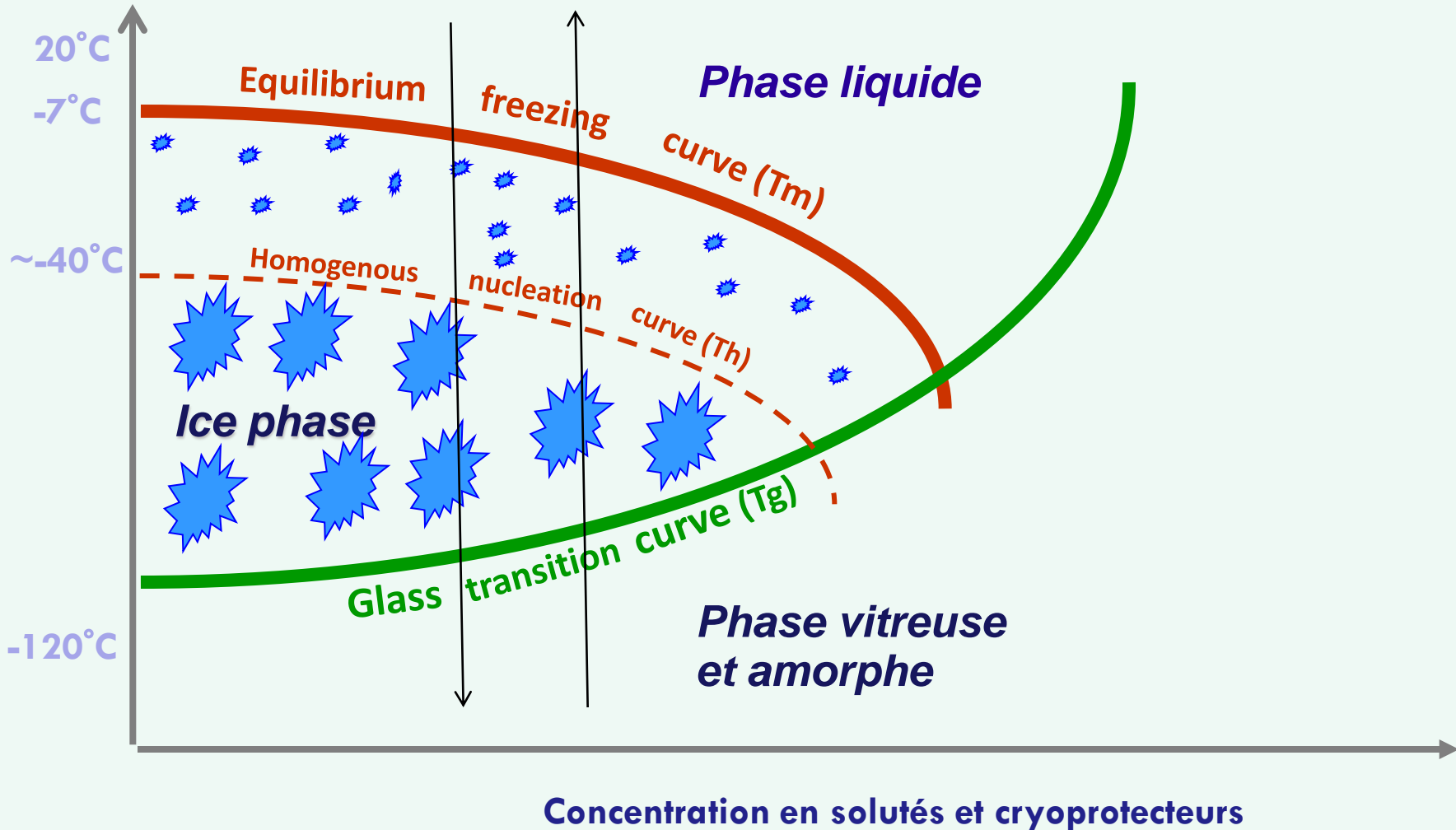
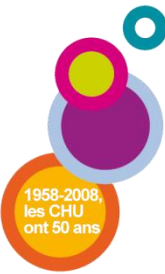
1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

Congélation lente

- équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux de la cellule → déshydratation
- faible concentration en cryoprotecteurs (1,5M)
glycérol ou propanediol (CP) et sucrose (CNP)
- Conditionnement en paillettes haute sécurité
- *induction de la cristallisation (seeding) pour diminuer la zone de surfusion délétère aux cellules*
- Refroidissement contrôlé avec pentes successives
congélateurs programmables
- Réchauffement rapide



Les différents états de l'eau



Les 2 grandes techniques de cryoconservation

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

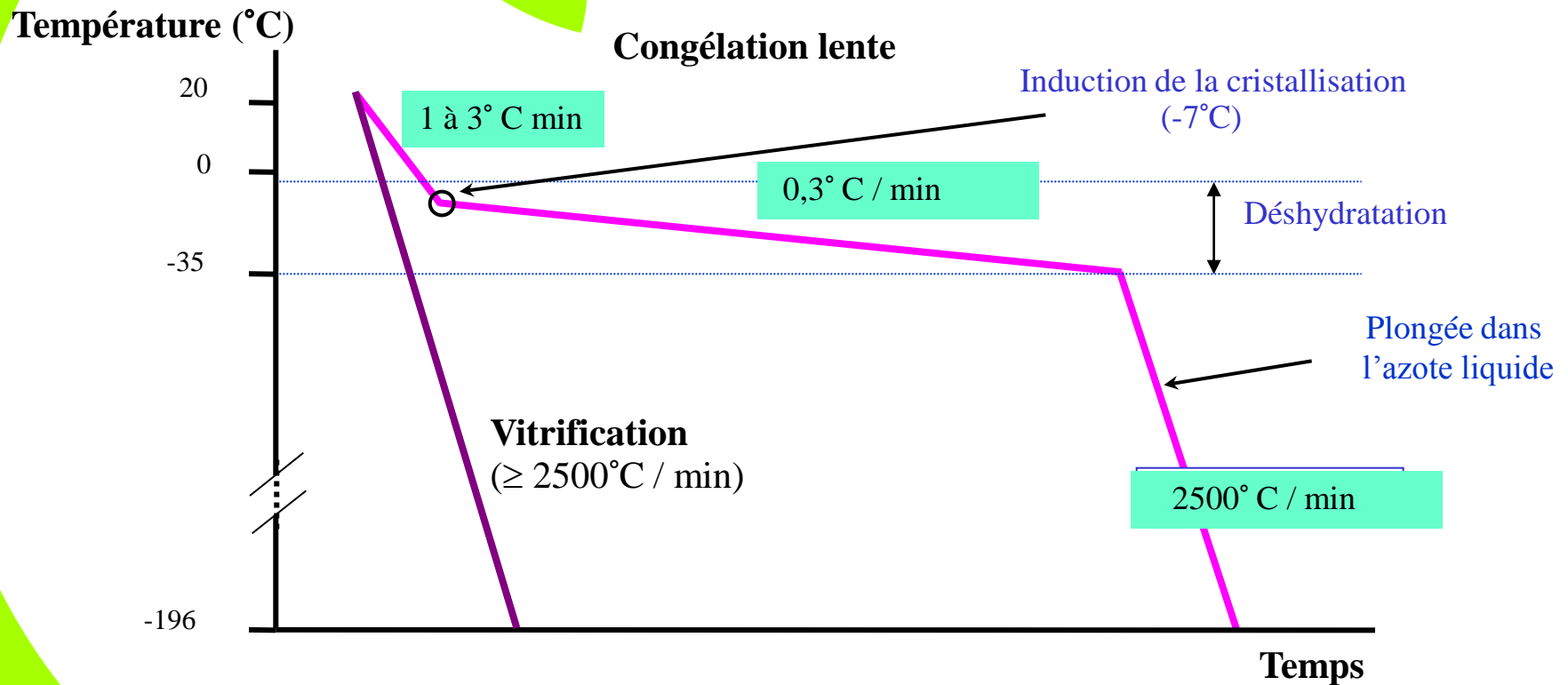
Vitrification

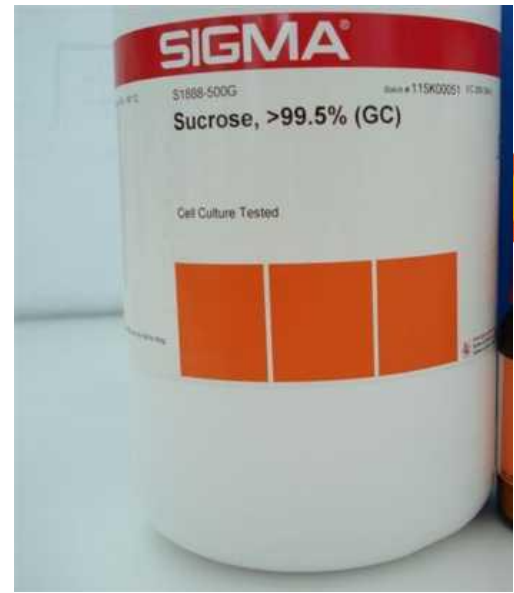
- passage direct de l'état liquide à l'état amorphe : aucun cristal ne se forme.
- elle est obtenue grâce à des vitesses de refroidissement élevées
(plongée directe dans l'azote liquide)
- forte viscosité: concentration finale d'exposition aux cryoprotecteurs élevée (5 – 7,5 M)
glycérol, DMSO, propanediol, éthylène glycol diversement associés et sucrose ± macromolécules
- Conditionnement sur divers supports
(plus le contact avec l'azote est direct plus la vitesse de refroidissement est grande: 2000 à 2000°C)
- **Réchauffement ultra-rapide (Mazur P, cryobiology 2011)**

Vitesse de refroidissement

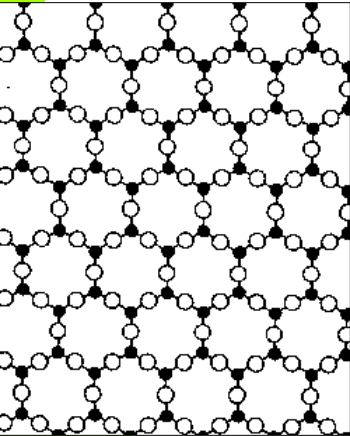
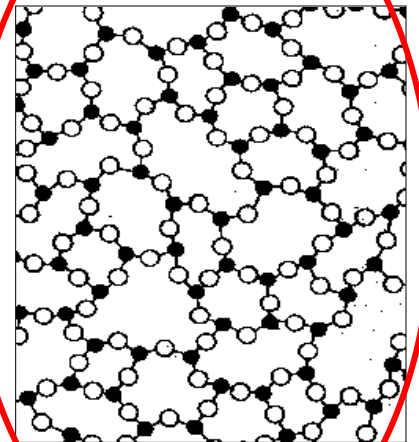
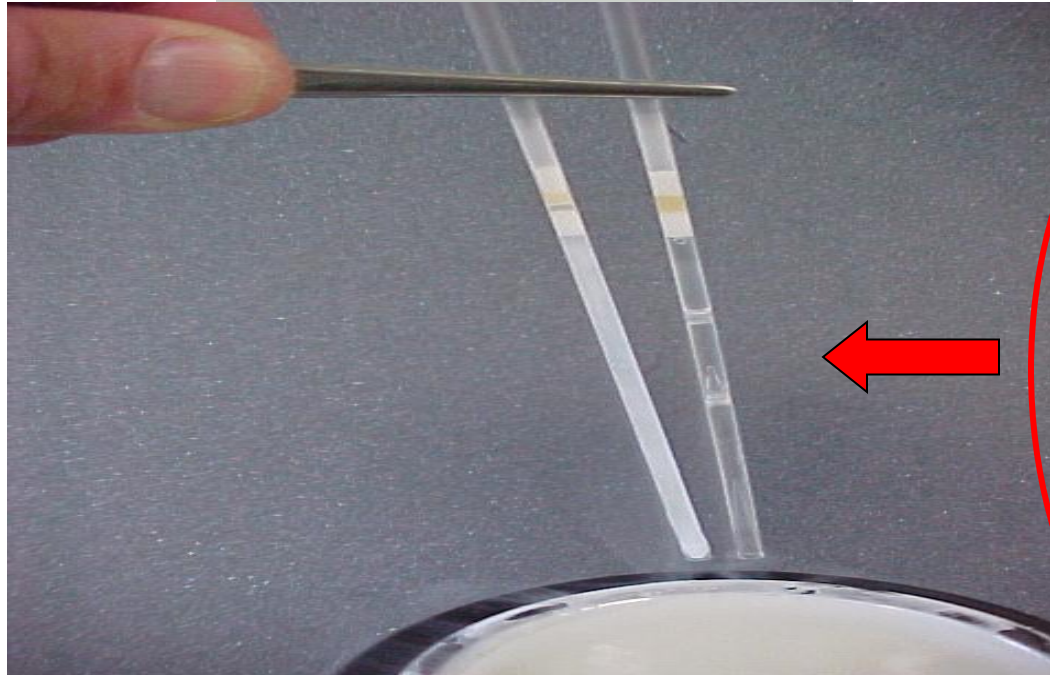


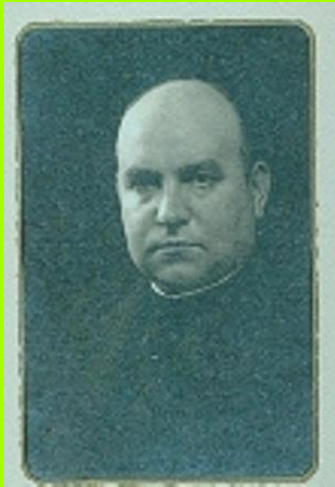
Congélation lente / Vitrification





1958-2008,
les CHU
ont 50 ans





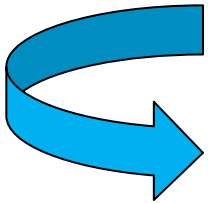
1897- 1974

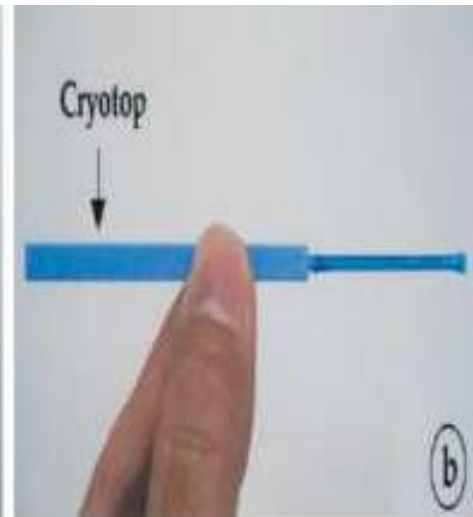
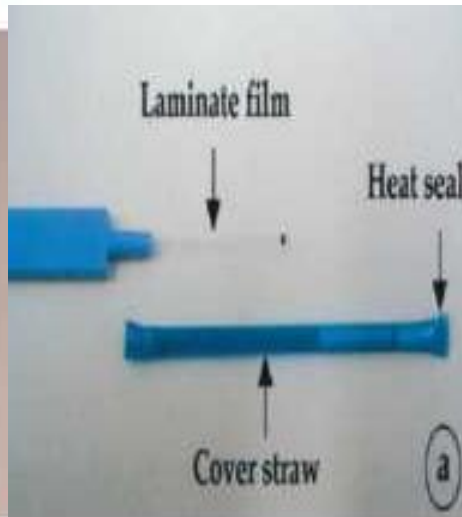
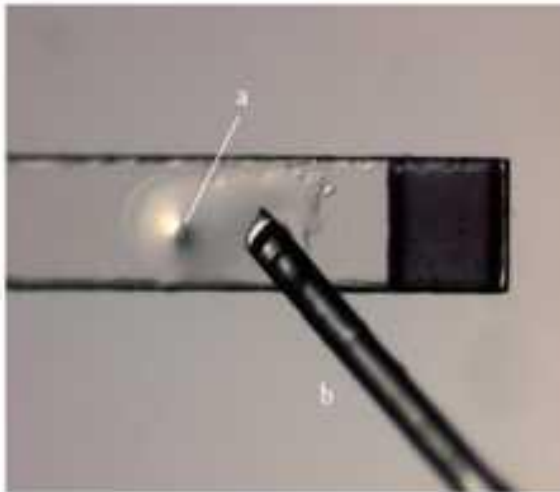
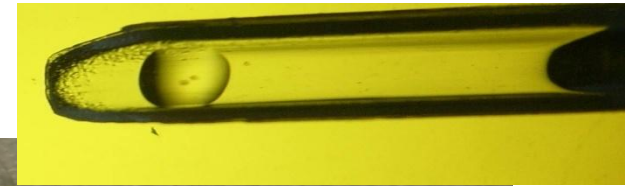
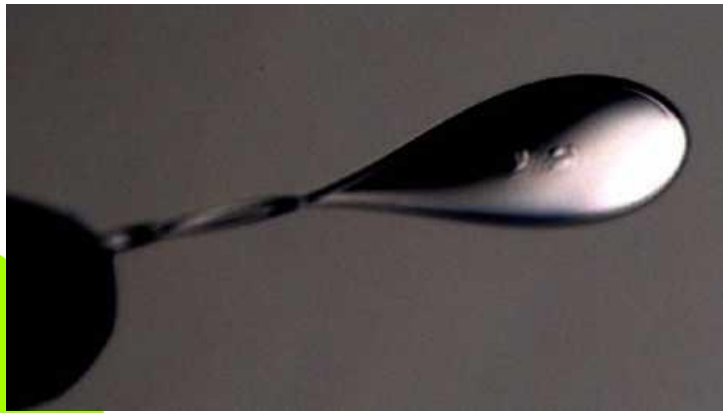
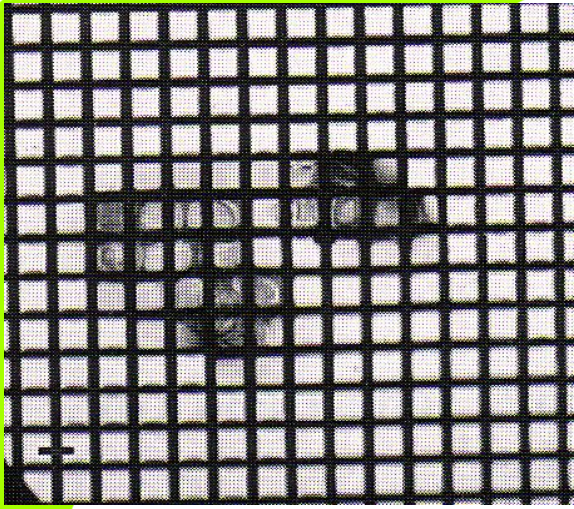
Pourquoi l'essor récent de la vitrification ?

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

Basile Luyet: 1937 vitrification de GR
1940: « Life and death at low
temperatures »

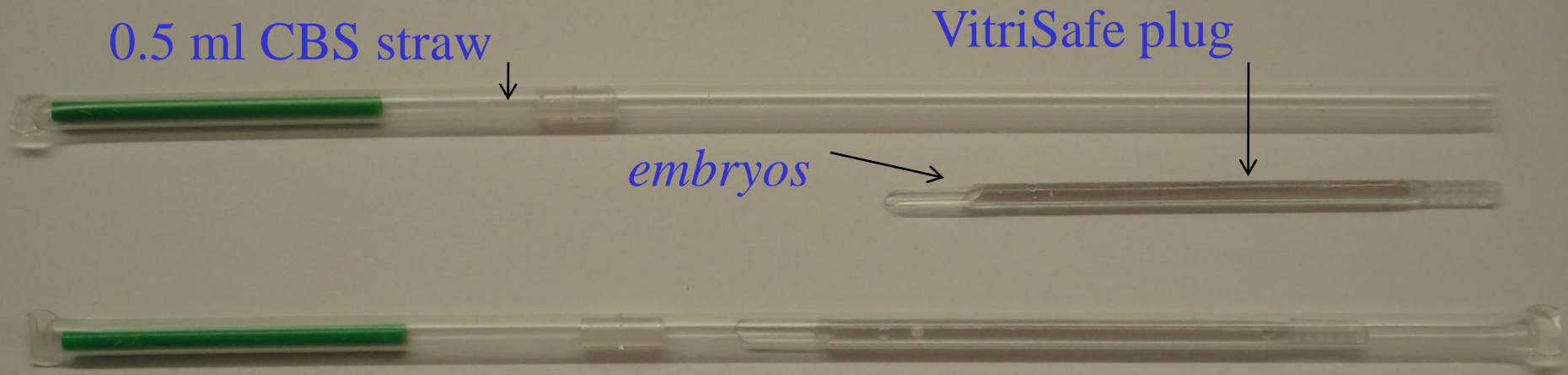
- **Technique ancienne:** 1985 pour l'embryon (souris, Rall et Fahy), 1989 pour l'ovocyte. Naissances normales chez la souris, le lapin, le rat, le mouton, le bovin (Massip), et l'humain (Wennerholm, 2009)
- **Peu utilisée chez l'humain** jusque 2001, car pas plus efficace, voire moins, sauf si contact direct avec l'azote liquide. Conservation difficile. Le développement de nouveaux types de supports relance cette méthode





Aseptic vitrification kit

“VitriSafe”

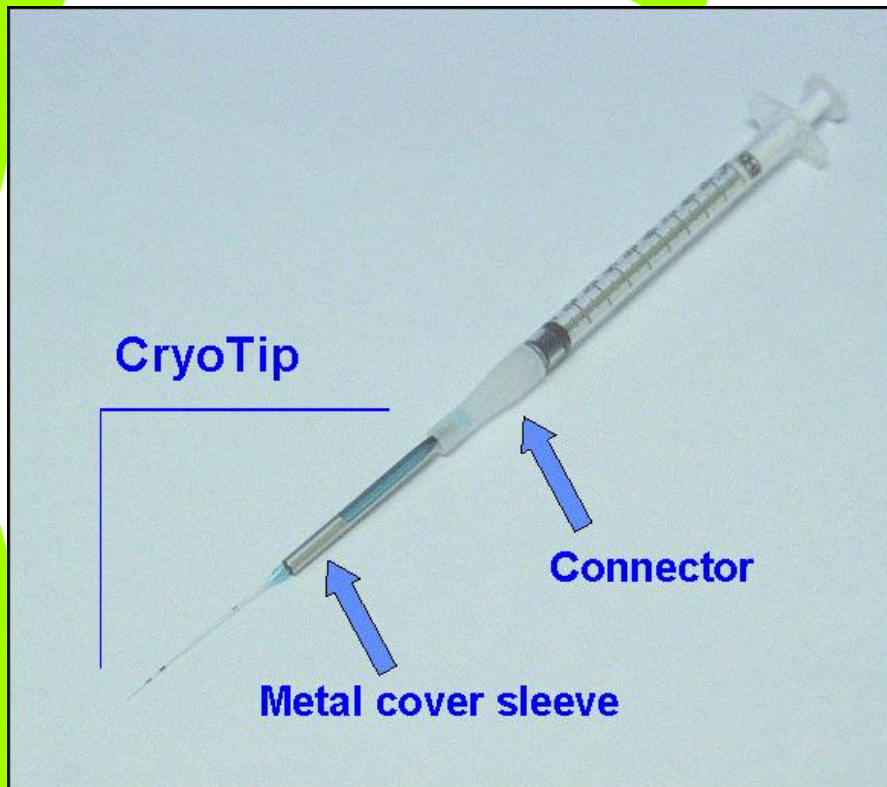


Vitrisafe inserted in 0.5 ml straw
Heat sealed
Ready to plunged in LN2

Cooling ~ 1.300 °C / min

Cryopette

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

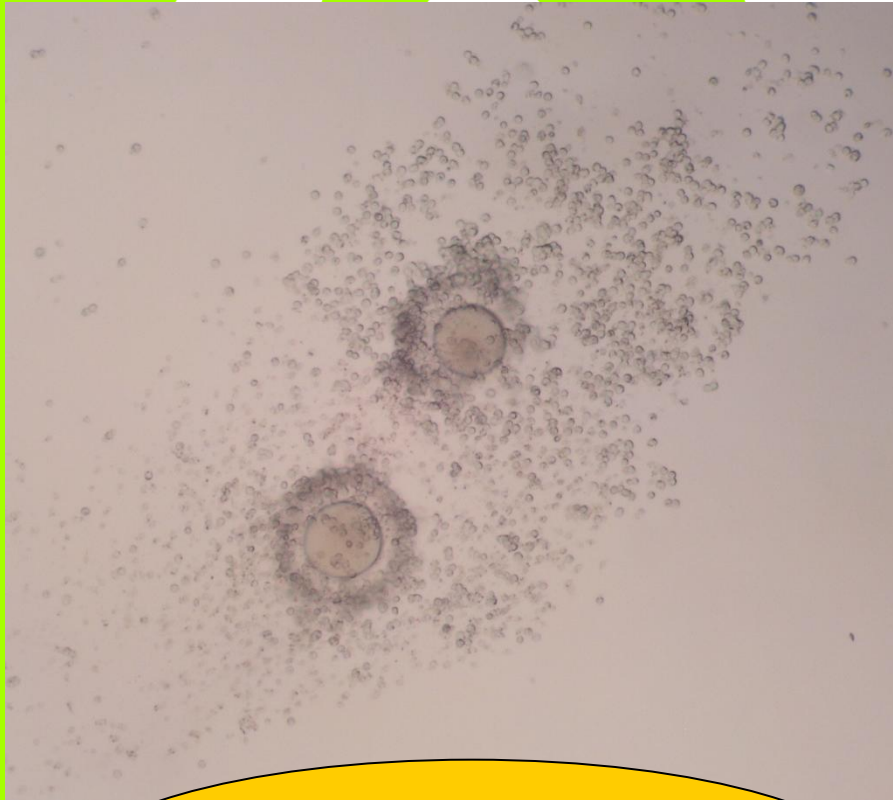


Azote non stérile

(Parmegiani L: UV sterilization)

Dans quelles indications la vitrification a-t-elle fait preuve de sa supériorité ?

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans




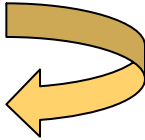
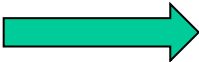

**Loi de bioéthique du 7 juillet 2011:
la technique de congélation ultra-rapide
des ovocytes est autorisée**

- Pour l'ovocyte, guère de doute:
**taux d'implantation par ovocyte
décongelé (2.3% en PS 0.1M; 9.1% en PS
0.2M, 11% en V).** Revues Oktay 2006,
Gook 2007, Tao, 2009)
- **Survie, TF, ϵ « top » > vs CL
(Cobo, 2011)**
- **Performances des ovocytes vitrifiés
identiques à celles des ovocytes
frais (Tulandi, 2008; Rienzi-Ubaldi,
2010)**
- **Efficacité du don non altérée:
(Cobo 2007, 2010)**



L. Rienzi et al. Hum. Reprod. 2010 25 :66-73

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

- 40 femmes (35.5 ans) 244 ovocytes
- ICSI pour 3 ovos frais ... 120 (TF= **83%**)  **0 grossesse**
- Ovos surnuméraires congelés (Kuwayama; cryotop)

- Décongélation (124 ovocytes): **96.8%** survie; TF = **79%** (\equiv frais)
- G/ cycle: 15/39 transferts (**38.5%**)
- **52%** « bons » embryons  IR: 19/94 (**20%**)
- 3 FCS = **20%**
 **Essai de « non-infériorité » convaincant**
- **Ualdi F (HR 2010):** taux cumulatif de naissance/stimulation (**53.3%**)
182 cycles avec ovocytes congelés... 104 réchauffement R1... 11 R2



Cobo et al RBM Online, 2011, 23: 341



- Don d'ovocytes
- 2 centres: IVI (Valence) RBA (Atlanta) → mêmes résultats
- 1119 cycles de don → 1241 receveuses (41 ans)
- 14 787 ovocytes → survie 92.6%
- 10414 2PN → taux de fécondation 76%
- Grossesses clinique / transfert → 55.5%
- 1.8 embryon / Transfert
- Bébés nés / Embryons transférés → 22% (489 / 2232)

Oocyte donation as a form of IVF treatment will be performed only through egg banking !!

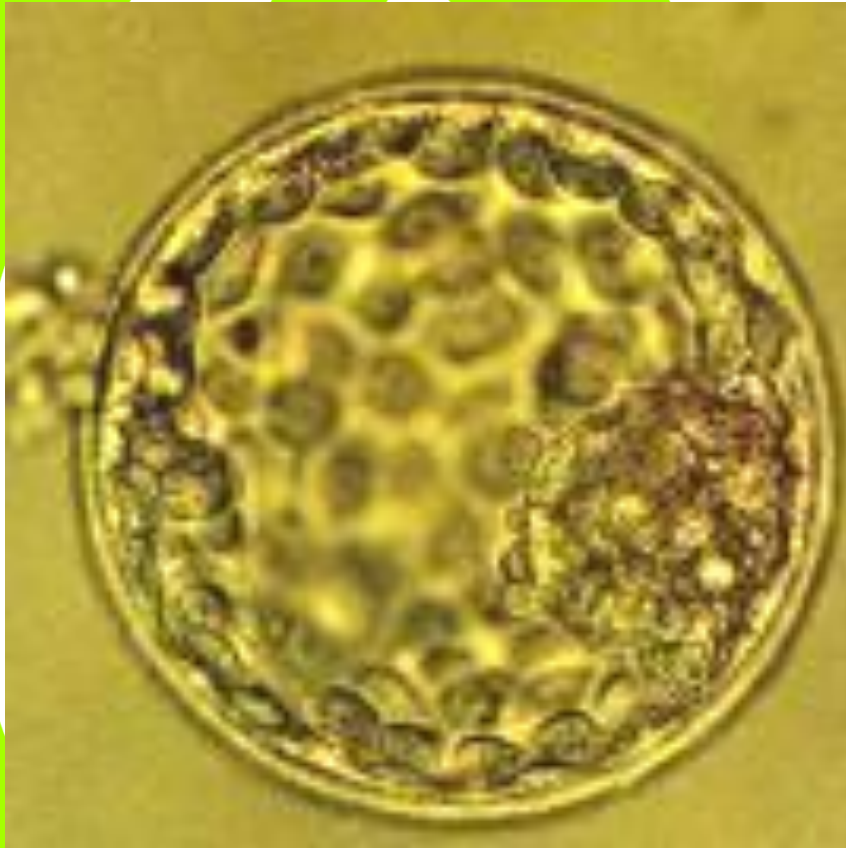


Dans quelles indications la vitrification a-t-elle fait preuve de sa supériorité ?

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

Le Blastocyste

- Résultats variables suivant les équipes, soit équivalents, soit supérieurs, dépendants de la sélection avant refroidissement et après réchauffement
- En France la culture prolongée et la congélation de blastocyste représentent **14%** de l'activité FIV/ICSI et **15%** de l'activité de transfert d'embryons congelés



Blastocyste: congélation lente ou vitrification

Youssry et al RBM online, 2008, 16: 311

Congélation	Etudes	Survie	G/T
Lente (3321 B)	Kaufman 95; Nakayama 95; Martin 03 Anderson 04; Veeck 04; Kuvayama 05 Stehlik 05; Liebermann 06	65 →95%	17 →69%
Vitrification (10261 B)	Cho 02; Mukaida 01 03; Hiraoka 04 Vanderzwalmen 01 03; Stehlik 05 Huang 05; Takahashi 05; Zech 05 Kuwayama 05; Utsunomiya 06 Liebermann 06,08, 10	60 →96% 90% (CT)	4.5 →54% 53%

AH et/ou ponction du blastocoele ne sont pas nécessaires

Lieberman J et Tucker MJ

FS, 2006, 86 (1) 20



254 TEC

Congélation lente

Vitrification

Survie

91%

95%

96%

97.5%

IR

30%

28%

33%

26%

G. Clin

43%

43%

48.7%

43%

Pas de différence significative entre les 2 techniques, ni même entre J5 et J6 avec les systèmes ouverts

Van Landhuyt L et al
HR, 2011 (26) 527



- **759 cycles de réchauffement (blastocystes J5 et J6)**
- **Paillettes fermées (CBS VIT High-Security)**
- **Survie: 71% (838/1125)**
- **Grossesse clinique par cycle de transfert: 18%**
- **Grossesse clinique par cycle de décongélation: 16.5%**
- **Taux d'implantation : 14% (116/842)**



Dans quelles indications la vitrification a-t-elle fait preuve de sa supériorité ?

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans



Le Zygote ?

- Pour Al-Hasani (2007), taux de survie de 89%
- Taux de grossesse clinique par transfert de 28% soit 3 fois plus qu'avec la congélation lente (10.2% !)
- Peu utilisé en France



L'embryon clivé précoce J2 –J3



- Le réel challenge c'est la congélation de l'**embryon clivé précoce** réalisée majoritairement en France (comme dans le monde) avec le protocole de **congélation lente (PROH-S)**
- Quels sont les résultats?

82 à 86 % des embryons
survivent et 62 à 67% sont
totalement intacts

- **Plus de 2000 enfants nés annuellement en France (2462 en 2009 ABM)**
- **Aucune inflation d'anomalie des enfants avec un recul de 25 ans et des centaines de milliers d'enfants nés dans le monde**
- **12% de naissances additionnelles par ponction**

Le bénéfice de la congélation € ? (Tenon 1999-2001 – 2010)

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

3112 € !

- **Etude rétrospective** (Achraf Benammar)
- 96 % des embryons congelés ont été utilisés (74.5%), détruits ou donnés
- Congélation au stade embryon clivé précoce (J2 ou J3)
- Même technique de congélation (lente), mêmes milieux
- Taux de survie embryonnaire stables 2000 – 2010: 85.6%
- Taux d'embryons totalement préservés stables: 63.5% %
- Résultats des TEC stables 2000-10 (12 à 15 % de naissances/TEC)
- TEC en cycles spontanés, stimulés ou artificiels

Chez les couples qui ont bénéficié d'une congélation embryonnaire

1958-2008,
HU
ans

840 ponctions (726 couples)
avec congélation ε

82 %

693 ponctions (602 couples)
avec décongélation ε

% TEF

TEF

TEC

TEF + TEC

26,8 %

225 G cliniques

147 G cliniques

372 GC (44,4%)

20,4 %

171 accouchements

107 accouchements

278 A (33,1%)

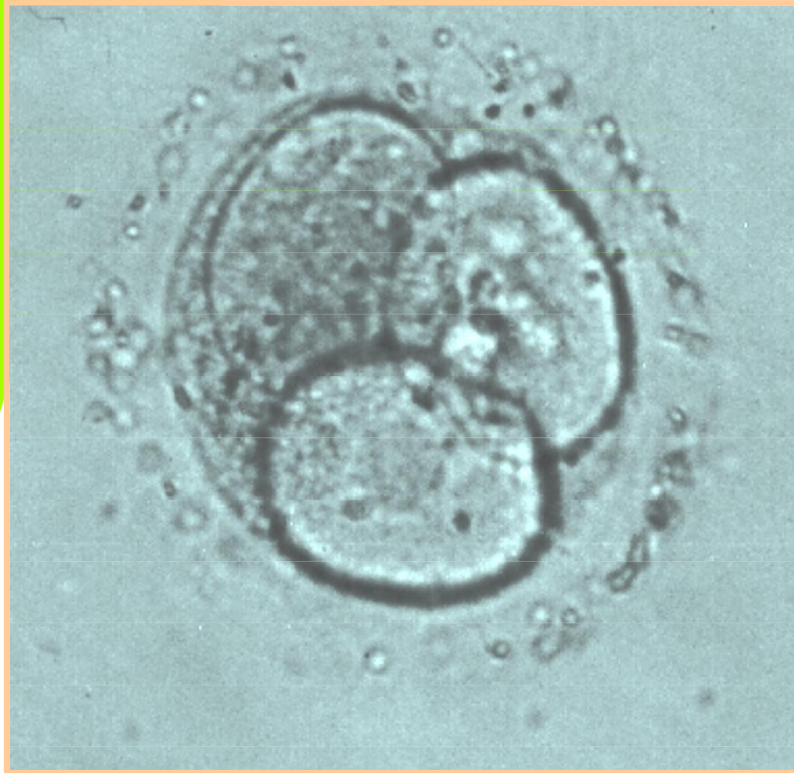
212 enfants nés

128 enfants nés

340 enfants nés

+ 12,7 % de NA

La vitrification fait-elle mieux ?



- Peu d'études comparatives: Rama Raju, Zheng, Kuwayama: meilleurs taux de survie mais en CL varient de 8 à 90%.

Balaban (2008) meilleurs taux de préservation totale (78%) mais en CL résultat non optimal (51%) et pas de comparaison des résultats de transferts

Idem pour Cobo (2009 ASRM) mais 30% seulement de préservation totale en CL vs 90% en vitrification

La perte blastomérique partielle lors du réchauffement explique la perte de viabilité des E congelés vs E frais. A qualité initiale égale, les E totalement préservés ont viabilité \equiv



Mais 90 % d'embryons intacts justifierait la vitrification !!!

Enquête BLEFCO novembre 2011



Belledonne/Oriade (St Martin d'Hyères), Ceres/Genbio (Beaumont), Cherest (Eylau), Clermont-Ferrand CHU, Cochin GHU, Hôpital Bonneville, IMR Marseille, Jean Verdier CHU, La Muette (Eylau), Le Mans, La Dhuis (Labm ZTP), Lyon CHU, Metz, Nancy (LMB Atoubio) Nantes CHU.

Rouen CHU, Toulouse CHU, Tenon GHU, Pau, Lille (PC du Bois), Angers CHU, Saint-Herblain PC Atlantique, Bichat CHU, Centre Picard, Nice CHU, Saint-Etienne CHU, Antoine Béchère CHU, Dijon CHU, La Conception Marseille, Labo Clément, IMM Montsouris, Montpellier CHU, Rennes CHU, Tours CHU.

**Blastocyste
Embryon J2/J3
Les deux**

**Merci à
tous**

Une enquête française (novembre 2011)



- 34 centres / 106 ont répondu
- 15 ont commencé la vitrification embryonnaire et déjà réalisé des transferts (44%) → 14 % des centres français ?
- Vitrification de blastocystes 10 centres; ECP: 1; les deux: 4

Stade	décongelés	transférés	100% BI	transferts	G. cliniques
Blastocystes	369	284 (76.9%) (1.25 € / T)		228	55 (24.1%) (vs 18.4% ABM)*
Embryons CP	219	208 (95%) (1.5 € / T)	89.5%	141	46 (32.6%) (vs 18.1% ABM)**

- * p< 0.05; ** p< 0.0001

Une sélection drastique des embryons ou la révolution où on ne l'attendait pas ??

Une enquête française (novembre 2011)

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

ECP J2/J3	décongelés	transférés	100% BI	Transferts	G. cliniques
Irvine (3 centres)	193	187 (96.9%)	175 (90.7%) (81.5 ... 94%)	124	42 (33.9%) (33.....38%)
Vitrolife (2 centres)	26	21 (80.8%)	21 (80.8%) (75 ... 81.8%)	17	4 (23.5%) (21.4...33.3%)
Total	219	208 (95%)	196 (89.5%)	141	46 (32.6%)

- **Aucune conclusion sur des séries d'effectifs différents; aucune différence significative des taux de grossesse**
- **très bonne préservation totale, particulièrement avec milieux Irvine**

Une enquête française (novembre 2011)



Blastocystes	décongelés	transférés	Transferts	G. cliniques
Irvine (9 centres)	295	243 (82%) (67...100%)	196	48 (24.5%) (0.....41.7%)
Vitrolife (4 centres)	39	26 (66.7%) (50...100%)	22	7 (31.8%) (0.....41.7%)
Origio 2 centres				

- **Aucune conclusion sur des séries d'effectifs différents; aucune différence significative des taux de grossesse**
- **bonne survie avec milieux Irvine mais large variations avec les 2 milieux**

Une enquête française (novembre 2011)

1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

Au total

- ❖ 366 transferts à partir d'embryons ou blastocystes vitrifiés en France
- ❖ 101 grossesses cliniques
- ❖ 3 accouchements: 2 dont 1 gémellaire (J Verdier);1 (Muette/Eylau)

Remarques des 34 centres

- difficultés techniques (5): apprentissage, dispositif N2, stockage
- chronophage (4): surtout si beaucoup d'embryons
- coût très élevé (6)

Arrêt de la congélation lente ?

- ✓ oui: 1 centre
- ✓ oui pour le blastocyste: 2 centres
- ✓ oui pour l'ECP: 1 centre

4 à 10 euros/ € (CL)

35 à 50 euros/ € (V)

B 350 = 94.5 euros

3.7 € / couple

La vitrification: le choix à faire en AMP?

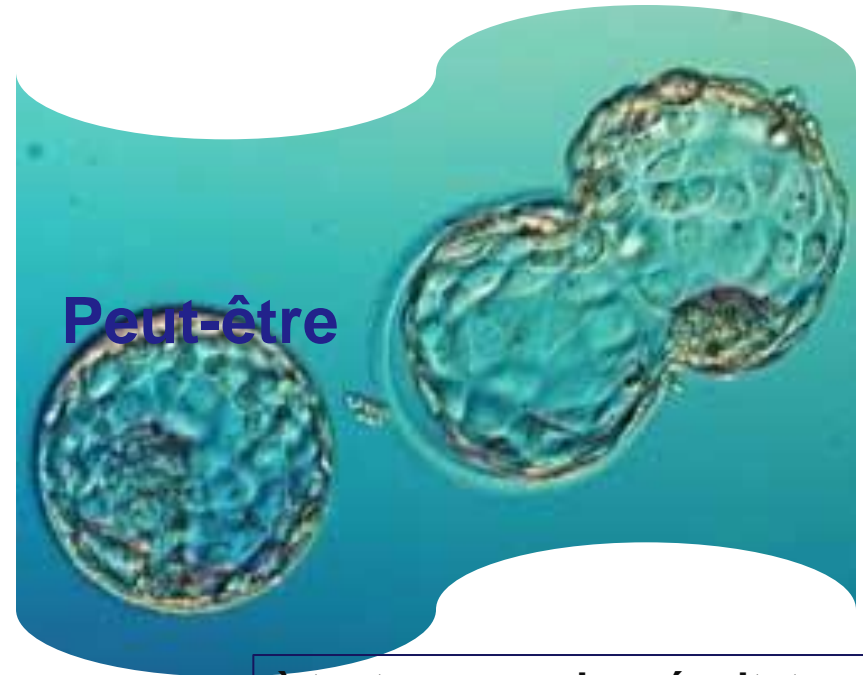
1958-2008,
les CHU
ont 50 ans

Vrai



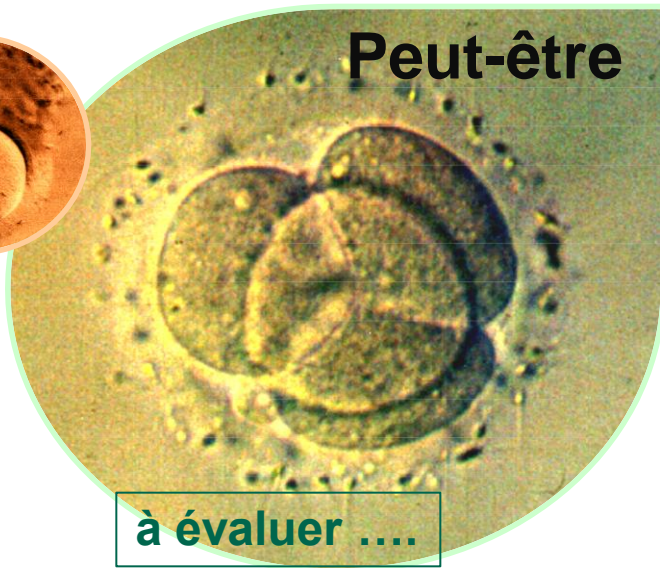
à confirmer avec systèmes fermés

Peut-être



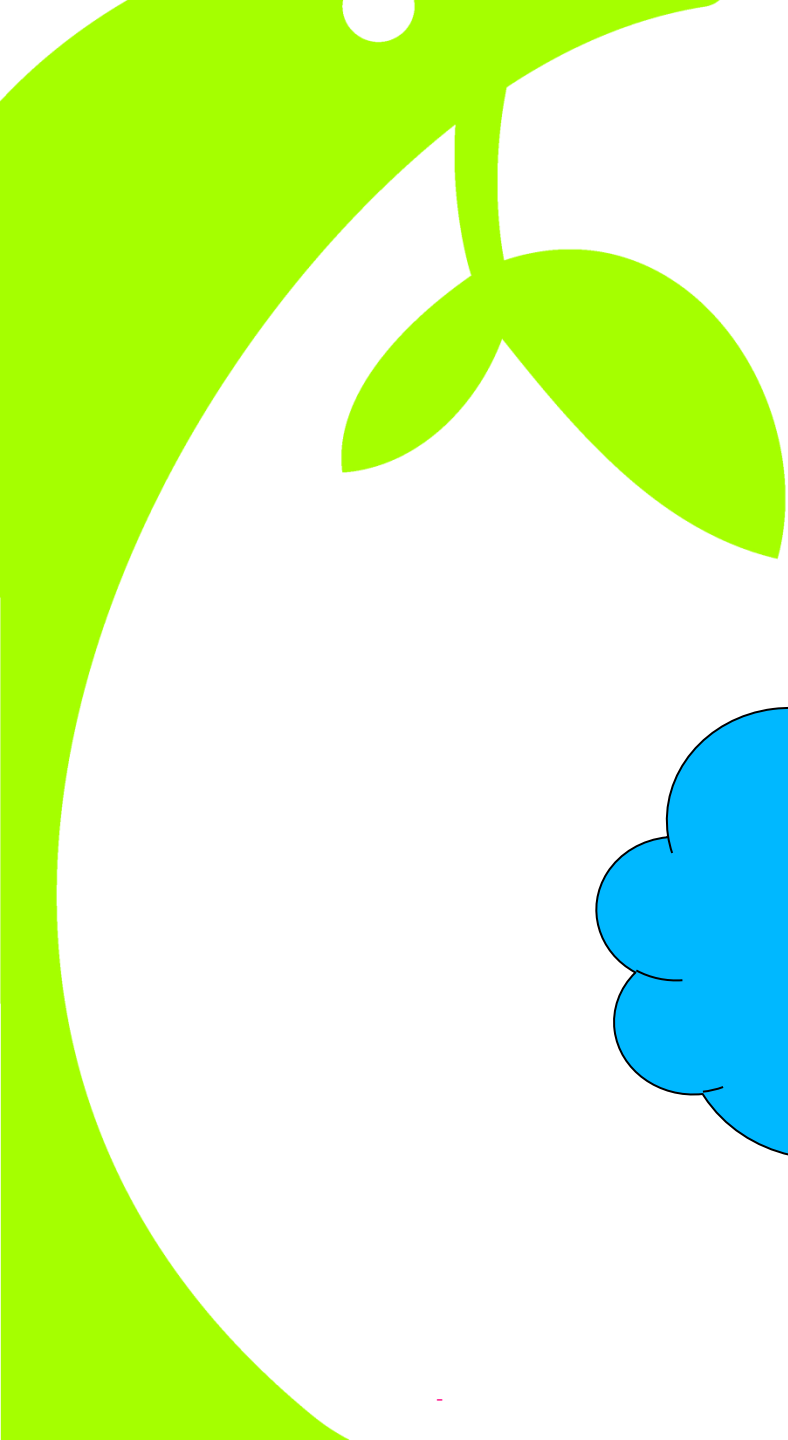
à tenter au vu des résultats actuels en C.Lente car au moins équivalents

Peut-être



à évaluer

Méthode alternative de congélation



Bon
appétit



Que sont devenus les embryons congelés ?



- 2309 utilisés pour un TEC – IC **74.2%**
- 482 détruits 15.5 %
- 175 donnés à la recherche 5.6%
- 25 donnés à l'accueil 0.8%
- 121 toujours conservés (19 couples) 3.9%

**Près des $\frac{3}{4}$ des embryons
congelés sont utilisés
pour le projet parental initial**