

Onzièmes Journées nationales de la FFER (Paris, 11–13 octobre 2006)

Cryopréservation des embryons humains par vitrification

Cryopreservation of human embryos by vitrification

P. Vanderzwalmen^{a,b,*}, N. Zech^a, A.-J. Greindl^b, F. Ectors^c, B. Lejeune^b

^a *Institute for reproductive medicine and endocrinology, Ramerstr. 2, Bregenz, Austria*

^b *Centre hospitalier interrégional Edith-Cavell (CHIREC), rue Edith-Cavell 32, 1180 Bruxelles, Belgique*

^c *GIGA Transgenic Platform, université de Liège, 23-3, avenue de l'Hôpital, 4000 Liège, Belgique*

Reçu le 16 juillet 2006 ; accepté le 21 juillet 2006

Disponible sur internet le 07 septembre 2006

Résumé

La vitrification est un processus par lequel un liquide se solidifie sans formation de cristaux. Cette technique de cryopréservation consiste à exposer pour de courtes durées les embryons à des concentrations élevées en cryoprotecteurs puis de les refroidir ultrarapidement, ce qui induit une augmentation de la viscosité favorisant la formation d'un état vitreux intra- et extracellulaire. Malgré l'obtention de taux de survie et de grossesse respectivement de l'ordre de 80 et 30 % accompagnés de la naissance d'enfants en parfaite santé, après vitrification de zygotes, d'embryons segmentés, de morulae et de blastocystes, une appréhension subsiste quant à son application dans les centres d'Assistance médicale à la procréation. L'utilisation de concentration élevée de cryoprotecteurs et de technique de refroidissement et de stockage des embryons dans des conditions non stériles sont des arguments qui discréditent la technique. Le but de cet article est de répondre dans la première partie à différentes questions concernant la technique et les appréhensions qu'elle suscite. Dans une deuxième partie seront présentés les résultats de la vitrification des embryons, et analysées les raisons liées à la difficulté de cryopréserver les blastocystes.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Vitrification is a cryopreservation strategy where cells are converted into a glass-like amorphous solid which is free of any crystalline structure. Such process is achieved by a combination of high concentration of cryoprotectant and an extremely high cooling rate. In the last years, survival rates of up to 80% after thawing and pregnancy rates of almost 30% could be achieved after transfer of vitrified embryos at the zygote, cleavage, morula and blastocyst stages. Also deliveries of healthy babies have been reported numerous times. To this day, a limited interest in this technique can be noted. The explanation may lie in the apprehension of many ART units regarding exposure of embryos to high concentrations of cryoprotectants and storage in non sterile conditions. The aim of the first part of this article, is to analyse if such fears are justified on the basis that vitrification mimics conditions already in use for many years in slow-cooling procedures where cells are plunged into liquid nitrogen at around -30°C and secondly since storage of embryos are now possible in high aseptic conditions. In the second part, results on survival after thawing, pregnancy rates and baby take home rates of vitrified embryos will be presented and the problems associated with vitrification of blastocysts will be discussed.

© 2006 Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Vitrification ; Cryopréservation aseptique ; Embryons ; Blastocyste

Keywords: Vitrification; Aseptic cryopreservation; Embryos; Blastocyst

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pierrevdz@hotmail.com (P. Vanderzwalmen).

1. Pourquoi un regain d'intérêt pour la cryopréservation ?

Depuis quelques décennies, l'Assistance médicale à la procréation (AMP) vient en aide aux couples qui présentent des problèmes d'infertilité. Dans cette optique, de nombreuses techniques ont été développées ou améliorées telles que les protocoles de stimulation ovarienne, les critères et procédés de sélection des gamètes et des embryons, les conditions et milieux de culture. Il en résulte que la proportion d'embryons viables et transférables a augmenté significativement ces dernières années. Par ailleurs, la prise de conscience des risques liés aux grossesses multiples a nécessité l'élaboration de normes limitant le nombre d'embryons transférés en une fois. En conséquence, la cryopréservation des embryons, du stade zygote au stade blastocyste, est devenue une étape nécessaire lors d'une tentative d'AMP. Deux approches ont été développées pour cryopréserver les ovocytes et les embryons : la congélation lente [1] et la vitrification [2]. C'est vers le milieu des années 1990 que cette dernière technique a émergé dans le domaine de l'AMP. Malgré tout, elle suscite encore quelques réticences quant à son application.

2. Pourquoi envisager la vitrification comme une alternative à la congélation lente ?

Au cours des différentes étapes d'un processus de cryopréservation que sont l'exposition aux cryoprotecteurs (CPs), le refroidissement, le stockage dans l'azote liquide, le réchauffement et le retour dans une solution physiologique, c'est le contrôle de la formation de cristaux de glace durant le refroidissement qui déterminera la viabilité embryonnaire après le réchauffement. En effet, la cristallisation est incompatible avec tout système vivant et doit être évitée le plus possible.

Lors d'un processus de congélation lente en présence de concentration en cryoprotecteur perméable de l'ordre de 1,5 M, deux facteurs majeurs induits par la formation de cristaux de glace intra- et extracellulaires sont responsables de la lyse cellulaire : le stress mécanique (refroidissement trop rapide) et l'effet de solution (refroidissement trop lent). La survie lors de la cryopréservation d'une cellule va donc dépendre d'un équilibre entre ces deux phénomènes.

Dans ce contexte, la vitrification est une autre stratégie de cryopréservation qui, contrairement à la congélation programmée, n'implique pas la formation de cristaux de glace. Par ailleurs, et en plus de l'absence de formation de cristaux de glace, cette technique est réalisée rapidement et permet donc d'éviter les problèmes de transition de zones de températures non physiologiques (« chilling »).

Un autre aspect non négligeable de cette technique réside également dans son faible coût car elle ne nécessite pas l'emploi d'appareil de congélation programmable.

3. Quelles sont les conditions pour obtenir un état vitrifié ?

La vitrification est la solidification d'une solution à très basse température sans formation de cristaux. Cet état amorphe

ou vitrifié est obtenu grâce à la combinaison de CPs en concentration élevée associée à une vitesse de refroidissement extrêmement rapide (2 000 °C/min à 20 000 °C/min).

3.1. Première condition : concentration élevée en cryoprotecteurs

Les milieux cryoprotecteurs habituellement utilisés pour la vitrification sont composés d'agents pénétrants la cellule (éthylène-glycol, DMSO, 1-2 propanediol) et d'agents non pénétrants de faible poids moléculaire (saccharose ou tréhalose). Dans certains protocoles, le milieu de vitrification est également additionné de polymères à haut poids moléculaire tels que le polyéthylène-glycol (PEG, PM 8 000), le ficoll (PM 70 000 ou 400 000) ou la polyvinyle-pyrrolidone (PM 360 000).

Dans la majorité des protocoles, la vitrification (refroidissement sans équilibre) consiste à exposer pour de courtes durées et en deux étapes les embryons à des concentrations croissantes en CPs.

Dans une première étape, les embryons sont exposés à une solution non vitrifiante (VS1) de CPs perméables (2,3 à 3,2 M) pour une période de l'ordre de deux à cinq minutes, en fonction du stade de développement embryonnaire dont chaque cellule a un rapport surface/volume bien déterminé.

Après une phase de déshydratation rapide (inférieure à 30 secondes), une certaine quantité de CPs (par exemple : seulement environ 30 % de la concentration initiale pour le zygote) pénètre dans les cellules durant les deux à cinq minutes d'exposition.

Dans la deuxième étape, les embryons sont mis en contact avec une solution vitrifiante (VS2) strictement extracellulaire de CPs perméables (4,8 à 6,4 M) et non perméables pour une courte période de 30 à 45 secondes avant d'être déposés sur le support (maximum deux embryons) et plongés dans l'azote liquide. Pendant cette deuxième étape, une seconde phase de déshydratation a lieu.

Au cours de ces deux étapes, un état vitrifiant intracellulaire est obtenu grâce à la déshydratation de l'embryon dans VS2 qui concentre les solutés intracellulaires : sels, protéines et les CPs qui ont pénétré la cellule au cours de VS1. L'état vitrifiant extracellulaire est obtenu grâce à la concentration élevée en CPs de VS2 qui encapsule l'embryon dans une gaine vitrifiante.

Par conséquent, la déshydratation des cellules est effectuée avant le refroidissement ainsi que l'obtention d'un état vitrifiant intra- et extracellulaire. Lorsque les embryons sont immergés dans l'azote liquide, le milieu, dont la viscosité est élevée, se solidifie si rapidement que les molécules n'ont pas le temps de se réarranger en structure cristalline, ce qui induit la formation d'un état vitreux intra- et extracellulaire.

Une autre stratégie proposée par Kuwayama et al. [3], consiste à exposer les embryons à la première solution (7,5 % DMSO-7,5 % EG) jusqu'au moment où l'embryon récupère son volume initial. Cette exposition prolongée dans le premier

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3950870>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3950870>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)