



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
 www.em-consulte.com



Quinzièmes Journées nationales de la Fédération française d'étude de la reproduction (Paris, 6–8 octobre 2010)

Vitrification et utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs : ceci justifie-t-il de préférer la congélation lente ?[☆]

Vitrification and the use of high concentrations of cryoprotectants: Is it a justified argument to prefer slow freezing?[☆]

P. Vanderzwalmen^{a,*,b,c}, N. Zech^a, B. Lejeune^b, B. Wirtleitner^a, M. Zech^a, F. Ectors^d

^a IVF Centers Prof. Zech, Bregenz, Autriche

^b Centre hospitalier interrégional Cavell (CHIREC), Braine l'Alleud, Belgique

^c GIGA-Research, University of Liège, Liège, Belgique

^d FNRS, GIGA Transgenic Platform, University of Liège, Liège, Belgique

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 5 juillet 2010

Accepté le 9 juillet 2010

Disponible sur Internet le 25 août 2010

Mots clés :

Vitrification

État vitrifiant

Cryoprotecteur

RÉSUMÉ

L'utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs (CPs) perméables pour vitrifier les ovocytes ou embryons est un des arguments majeurs évoqués par les nostalgiques de la congélation lente pour ne pas implémenter cette technique dans un programme d'AMP. Il est effectivement tellement plus simple de placer les ovocytes et/ou embryons dans un appareil de congélation programmable et de lancer un programme de refroidissement lent. Qui s'est posé la question des conséquences osmotiques et des concentrations intracellulaires en CPs atteintes à la fin d'un refroidissement lent ? Il ressort de trois études successives sur le zygote de souris que : (i) la concentration intracellulaire en CPs est de loin inférieure aux concentrations des solutions employées dans nos programmes de vitrification, (ii) la concentration intracellulaire en CPs du zygote vitrifié est inférieure à la concentration intracellulaire en CPs observée lors d'un processus de congélation lente, (iii) lors d'une congélation lente, la survie des zygotes est le reflet de la présence d'un état vitrifiant intracellulaire.

© 2010 Publié par Elsevier Masson SAS.

ABSTRACT

The use of high levels of cryoprotectants (CPs) in solutions applied to vitrify oocytes or embryos is an argument to still prefer slow freezing procedure. Is it a justified argument? Out of three studies using mice zygotes we may assume that (i) the intracellular concentration of CPs is far lower than the one in the vitrification solutions, (ii) the intracellular concentration of CPs in the vitrified zygote is in contrary to the common beliefs even lower than the one observed after a slow freezing procedure, (iii) survival after slow freezing reflects the presence of an intracellular vitrified state in these cells.

© 2010 Published by Elsevier Masson SAS.

Keywords:

Vitrification

Vitrified state

Cryoprotectant

1. Introduction

La vitrification ou passage d'une solution à l'état de glace amorphe permet d'éviter la formation de cristaux de glace en utilisant des concentrations élevées en cryoprotecteurs (CPs),

induisant une élévation de la viscosité du milieu et en appliquant des vitesses de refroidissement et de réchauffement suffisamment rapides pour garantir cet état vitreux.

Plusieurs études concluent à la supériorité de la vitrification en termes de survie post-réchauffement et de grossesses ainsi qu'une absence de risques accrus en termes de malformations (1,3 %) comparativement aux enfants conçus spontanément ou après fécondation in vitro (FIV) [1,2].

Malgré tout, il subsiste encore des réticences de certains acteurs du monde médical et scientifique pour introduire cette technique comme moyen de cryopréservation des ovocytes et embryons dans le cadre d'un programme d'Assistance médicale à la procréation (AMP).

[☆] Voir également, dans ce numéro, la deuxième partie du sujet : **Support fermé : une réalité clinique pour vitrifier en conditions aseptiques les ovocytes et embryons** (P. Vanderzwalmen, N. Zech, Y. Prapas, Y. Pnagiotidis, A. Papatheodorou, B. Lejeune, D. Jareño, S. Vanderzwalmen, F. Factors).

* Auteur correspondant.

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

Deux raisons sont fréquemment à l'origine des réticences invoquées.

La première concerne les conditions non aseptiques de refroidissement et de stockage dans des systèmes de contention non hermétiquement clos. L'introduction d'un système fermé comme le « VitriSafe », garantissant une asepsie totale, nous a permis de vitrifier avec succès des ovocytes, des zygotes et des blastocystes [3].

La deuxième raison qui suscite une crainte non négligeable, et qui fait l'objet de cet article, concerne l'exposition avant refroidissement des ovocytes ou embryons à des solutions de CPs de concentrations fortes élevées (5 à 7 M) comparativement à celles employées lors d'une congélation lente (1,5 M).

Au cours de l'étape finale précédant l'immersion dans l'azote liquide (LN2), les ovocytes ou embryons sont exposés à la solution vitrifiante de concentration très élevée. Il se produit instantanément une déshydratation avec concentration des protéines et sels intracellulaires ainsi que des CPs ayant pénétrés dans la cellule durant les premières phases d'exposition. C'est cette augmentation des concentrations en sels, protéines et CPs qui permet de répondre aux contraintes liées aux conditions de la formation d'un état vitrifiant intracellulaire. L'absence de cristaux extracellulaires est, quant-à-elle, obtenue grâce à l'enrobage des ovocytes ou des embryons par cette solution hautement concentrée qui correspond à la concentration minimale en CPs permettant d'obtenir un état vitrifiant au refroidissement et de le maintenir au réchauffement pour des vitesses de refroidissement et réchauffement ad hoc.

La probabilité d'obtenir un état vitrifiant intracellulaire est proportionnelle à la concentration intracellulaire en CPs (viscosité) et aux vitesses de refroidissement-réchauffement [4]. Les durées d'exposition étant entre autres dépendantes du système de contention utilisé qui détermine les vitesses.

Ces étapes successives d'exposition du matériel biologique à des solutions de CPs très hyperosmotiques sont des arguments pour favoriser, dans certains pays ou centres d'AMP, la congélation lente, au détriment de la vitrification.

L'objectif de nos travaux consiste à mieux cerner les concentrations en CPs présentes dans la cellule juste avant de plonger le matériel biologique dans LN2. Dans ce but, trois études ont été effectuées en utilisant l'embryon de souris comme modèle expérimental :

La première a pour but de déterminer la concentration intracellulaire en sels et CPs dans le zygote après application de différents schémas d'exposition au CPs en vue de le vitrifier.

La deuxième expérience a pour but de comparer les concentrations intracellulaires en CPs lors d'un processus de vitrification ou de congélation lente de zygotes ou de blastocystes.

Finalement, dans la troisième expérience sur des blastocystes, nous allons tenter d'apporter des arguments en faveur de la présence d'un état vitrifiant intracellulaire lors d'une congélation lente.

2. Matériel et méthodes

2.1. Stimulation et récolte des embryons de souris FVB/N au stade zygote et leur mise en culture jusqu'au stade blastocyste

La stimulation ovarienne est induite par une première injection intrapéritonéale (i.p.) de Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) (Folligon[®], IntervetTM) suivie 48 heures plus tard par l'induction de l'ovulation à l'aide d'une seconde injection i.p. d'HCG (Chorulon[®], IntervetTM). Dix-huit heures après les avoir mises au mâle, puis observation du bouchon vaginal, les femelles sont sacrifiées par dislocation cervicale et les zygotes sont récoltés dans du milieu M2.

2.2. Vitrification

La méthode de vitrification décrite est celle employée en routine pour la cryopréservation de zygotes et blastocystes de souris transgéniques et qui est la base de notre protocole de vitrification d'embryons humains.

2.2.1. Exposition aux cryoprotecteurs

2.2.1.1. Vitrification en système « ouvert » : en deux étapes. Les zygotes ou blastocystes sont exposés à T° ambiante à des solutions cryoprotectrices préparées à base de milieu M2 :

- pendant trois minutes à une solution non vitrifiante de 10 % DMSO (diméthylsulfoxyde) – 10 % éthylène Glycol (EG) (nVS1) ;
- suivie pendant 45 à 60 secondes à une solution vitrifiante de 20 % DMSO – 20 % EG – 0,75 M sucrose (VS2).

2.2.1.2. Vitrification en système « fermé » : en trois étapes. Les zygotes ou blastocystes sont exposés à T° ambiante à des solutions cryoprotectrices préparées à base de milieu M2 :

- pendant trois à cinq minutes à une solution vitrifiante de 5 % DMSO – 5 % EG (= nVS) ;
- pendant trois minutes à nVS1 ;
- suivie pendant 45 à 60 secondes à VS2.

2.2.2. Système de contention et Refroidissement

2.2.2.1. Support « ouvert » : vitesse de refroidissement supérieure à 20 000 °C par minute. Une spatule en plastique et en forme de gouttière sur laquelle on dépose une faible quantité de CPs (< 1 µl) contenant les zygotes ou blastocystes est la base de nos systèmes de contention. Cette spatule, « Hemi-Straw – Vitriplug[®] », sera mise en contact avec LN2 pour atteindre une vitesse de refroidissement ultra-rapide [5].

2.2.2.2. Support « fermé » : vitesse de refroidissement inférieure à 2000 °C par minute. Dans le but de garantir une asepsie maximale, la spatule ou « Vitrisafe[®] » est insérée dans une paillette de protection CBS de 0,3 ml qui sera complètement scellée par soudure thermique à ces extrémités, avant d'être plongée dans LN2.

2.2.3. Réchauffement

Indépendamment de la méthode de refroidissement utilisée, la procédure de réchauffement est toujours ultrarapide : le support est extrait de la paillette de protection en évitant tout contact avec LN2, et son extrémité, qui porte la goutte de CP et les embryons, est directement plongée dans 3 ml d'une solution de sucrose à température ambiante. Une vitesse de réchauffement de plus de 20 000 °C par minutes est atteinte.

2.3. Congélation lente

Après induction manuelle de la cristallisation à –6 °C, la congélation lente consiste en un refroidissement lent de 0,3 °C par minute. En fonction des études, les zygotes seront plongés dans LN2 pour des températures variant de –30 à –70 °C.

2.4. Études

2.4.1. Première étude : détermination de la concentration intracellulaire en CPs après la période d'exposition à ces CPs

Objectif : la stratégie utilisée pour connaître la concentration intracellulaire en CPs présente dans un zygote juste après

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3952209>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3952209>

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