

Vitrification embryonnaire : Présentation de la première naissance Tunisienne d'embryon vitrifié et revue de la littérature

Embryo vitrification: first Tunisian live birth following embryo vitrification and literature review

Achour Radhouane¹, Hafhouf Emna², Ben Aissa Imen², Basly Mohamed², Rachdi Radhouane¹

1- Service des urgences de gynécologie-obstétrique ; centre de maternité et de néonatalogies de Tunis

2-Service de gynécologie-obstétrique de l'Hôpital Militaire de Tunis

RÉSUMÉ

La cryopréservation embryonnaire est un temps essentiel dans la reproduction médicalement assistée. La possibilité de congeler des gamètes et des embryons offre des possibilités uniques pour les patients présentant diverses indications. Après revue de certains détails techniques de la congélation embryonnaire, la procédure de la vitrification par rapport à la congélation lente (CL) est discutée. Il est reconnu que la technique de congélation lente est encore appliquée dans la majorité des centres de fécondation in vitro (FIV), mais il existe des preuves démontrant les avantages de la vitrification. Des exemples théoriques et pratiques sont désormais suffisants pour convaincre l'embryologiste que le temps est venu pour passer à la technique de vitrification.

Nous rapportons notre expérience qui est la première grossesse Tunisienne après remplacement d'embryon vitrifié dévitrifié au stade de blastocyste colligée à l'hôpital militaire de Tunis-Tunisie. Il s'agit de Mme BF âgée de 29ans, qui a présenté une infertilité primaire de 3 ans d'origine masculine. Une FIV avec micro-injection lui a été indiquée permettant d'obtenir 7 blastocystes à J5 dont 2 remplacés et soldé par une grossesse arrêtée à 6SA. La méthode de Vitrification est une procédure qui consiste à plonger les embryons directement dans l'azote liquide à -196°C. ce qui permet d'atteindre des descentes en température de l'ordre de -2000°C par minute à l'intérieur d'une paillette sécurisée. Le Kit utilisé dans notre laboratoire est « Irvine Scientific » avec paillette cryobiocystem. Six mois plus tard 2 blastocystes dévitrifiés en février 2012 puis remplacés ont permis d'obtenir une grossesse évolutive menée à terme avec un accouchement par césarienne d'un nouveau-né de sexe masculin en bonne santé.

Mots-clés

Vitrification, embryons, FIV, grossesse

SUMMARY

Embryo cryopreservation is an essential tool in assisted reproduction. The option to freeze gametes and embryos provides unique possibilities for patients with various indications. After a review on some of the technical details of embryo freezing the idea of vitrification compared to slow freezing is discussed. It is recognized that the slow freezing technique is still overwhelmingly applied in most human in vitro fertilization (IVF) centers, but there is mounting evidence demonstrating the benefit of vitrification. Theoretical and practical examples are now sufficient to convince the embryologist that the time has arrived to switch to the vitrification technique.

We report our experience that is the first Tunisian live birth following embryo vitrification at the blastocyst stage, collected at the military hospital of Tunis-Tunisia.

A 29-year-old woman presented a primary infertility of 3 years of male origin. IVF with intra-cytoplasmic spermatozoid injection ICSI has been indicated. 7 blastocysts were obtained at fifth day. Two of them were replaced and ended in terminated pregnancy at 6AW. Vitrification method is a procedure which is to immerse the embryos directly into liquid nitrogen at -196 ° C. thereby achieving descents temperature of about -2000 ° C per minute within a secure glitter. The kit used in our laboratory is "Irvine Scientific" with glitter cryobiocystem. Six months later 2 blastocysts were devitrified in February 2012 and after replacement provided a normal progress pregnancy, delivery by caesarean section of a newborn male in good health.

Key - words

Vitrification, embryo, IVF, pregnancy

La vitrification est une technique de conservation des embryons ou des ovocytes qui empêche la formation de cristaux intracellulaires. La cristallisation est incompatible avec la conservation cellulaire, ce qui a été mis en évidence dès 1937 par LUYET(1).

Elle est utilisée depuis plus de 20 ans chez l'animal avec des taux de survie aux alentours de 80 %(2).

La vitrification est un processus par lequel un liquide se solidifie sans formation de cristaux(3). Cette Technique de cryopréservation consiste à exposer pour de courtes durées les embryons à des concentrations élevées en cryoprotecteurs puis à les refroidir ultra-rapidement, 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(4).

OBSERVATION

Nous rapportons la première grossesse Tunisienne après remplacement d'embryon vitrifié dévitrifié au stade de blastocyste colligée à l'hôpital militaire de Tunis-Tunisie.

Il s'agit de Mme BF âgée de 29 ans, sans antécédents pathologiques notables, qui présente une infertilité primaire de 3 ans d'origine masculine en rapport avec une oligo-asthénospermie sévère. Le bilan d'exploration féminine est strictement normal. Une première tentative faite en Septembre 2011 : protocole de stimulation long agoniste GNRH avec 24 ampoules de gonadotrophine F et déclenchement à J11 a permis la ponction de 17 ovocytes dont 14 matures. 12 fécondés après micro-injections « ICSI ».

Nous avons obtenu 12 embryons à J2-J3. Nous avons choisi de faire une culture prolongée, 7 blastocystes de bonne qualité ont été obtenus à J5 dont 2 ont été transférés et 5 vitrifiés.

Une grossesse a été obtenue après ce transfert soldée par une fausse couche spontanée à 6 SA.

Les étapes de congélation et décongélation ont été effectuées en utilisant les kits Irvine et les paillettes CryoBioSystem. Six mois plus tard, on a procédé à la dévitrification de 2 blastocystes en février 2012 puis le transfert après préparation de l'endomètre par de l'oromone* 2mg : 2cp /j de J3 à J15 (endomètre à 10mm le jour du transfert).

Nous avons obtenu une grossesse évolutive (taux de BHCG à J11 post remplacement à 380UI/l). Le suivi prénatal de cette grossesse n'a révélé aucune anomalie. Tout le bilan prénatal et les échographies étaient normaux. L'accouchement a été programmé par césarienne à 38SA+3js soit le 19/10/2012, il a donné naissance à un nouveau-né de sexe masculin PN=2855 gr en bonne santé, les suites postopératoires ont été simples.

DISCUSSION

Au vu des données de la littérature, il apparaît clairement que la vitrification embryonnaire est plus efficace que la congélation lente, notamment sur le taux de survie des embryons après décongélation et sur ceux de grossesses après transfert(11). La vitrification est particulièrement performante lorsqu'elle concerne des blastocystes,

alors que la congélation lente se révèle peu efficace à ce stade de développement embryonnaire(11). La culture prolongée, dont l'objectif est de promouvoir le transfert d'un seul embryon, prendrait ainsi tout son sens en permettant de congeler efficacement les blastocystes "surnuméraires"(5).

Malgré tout, elle suscite encore quelques réticences quant à son application. 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, a permis de vitrifier avec succès des ovocytes, des zygotes et des blastocystes (6,7). La deuxième raison qui suscite une crainte non négligeable, concerne l'exposition avant refroidissement des ovocytes ou embryons à des solutions de cryoprotecteurs (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 répondre aux contraintes liées aux conditions de la formation d'un état vitrifiant intracellulaire(12). 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.

La probabilité d'obtenir un état vitrifiant intracellulaire est proportionnelle à la concentration intracellulaire en CPs (viscosité) et aux vitesses de refroidissement- réchauffement (3,6). 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 hyperosmotiques sont des arguments pour favoriser, dans certains pays ou centres d'AMP, la congélation lente, au détriment de la vitrification.

Des travaux avaient comme objectif 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 (1,2,8) :

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, la troisième expérience sur des blastocystes, vise à apporter des arguments en faveur de la présence d'un état vitrifiant intracellulaire lors d'une congélation lente.

Il ressort des trois études successives qu'à la suite des étapes d'exposition aux CPs, la concentration intracellulaire en CPs est de loin inférieure à la concentration de la solution vitrifiante utilisée (VS2). Ces études ont pu montrer que la concentration intracellulaire en CPs

d'un embryon vitrifié était inférieure à la concentration intracellulaire en CPs d'un embryon cryopreservé par le processus de congélation lente. Finalement on peut affirmer que lors d'une congélation lente, la survie des ovocytes ou embryons reflète la présence d'un état vitrifiant intracellulaire. La congélation lente est utilisée depuis plus de 30 ans sans véritable prise de conscience que la survie cellulaire est la conséquence de la présence d'un état vitrifiant intracellulaire.

Certains cryobiologistes craignent d'exposer les ovocytes et/ou embryons à des concentrations élevées en CPs, qu'ils les cryopreservent dès lors par le biais de la vitrification ! Plusieurs études(13,14,15) concluent à la supériorité de la vitrification en termes de : taux de survie (TS) (% d'embryons ayant 50 % de blastomères intacts après décongélation), de taux de survie intact (TSI) (% d'embryons ayant 100 % de blastomères intacts après décongélation), de l'indice de survie blastomérique (ISB) (% de blastomères intacts par embryon ayant survécu) et de taux de grossesse clinique (TGC) défini comme la présence d'un sac gestationnel intra-utérin avec activité cardiaque à l'échographie.

Références

- 1-Tominaga K. Cryopreservation and sexing of in vivo and in vitro produced bovine embryos for their practical use. *J Reprod Dev* 2004;50:29–38.
- 2- Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed* 2004;9:162–70.
- 3- Camus A, Clairaz P, Ersham A, Van Kappel AL, Savic G, Staub C. Principe de la vitrification : cinétiques comparatives. *Gynecol Obstet Fertil* 2006;34:737–45.
- 4- Vanderzwalmen P, Zech N, Greindl AJ, Ectors F, Lejeune B . Cryopréservation des embryons humains par vitrification. *Gynecol Obstet Fertil* 2006;34:760–9.
- 5- Vanderzwalmen P, Zech N, Lejeune B, Wirtleitner B, Zech M, Ectors F. Vitrification et utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs : ceci justifie-t-il de préférer la congélation lente ? *Gynecol Obstet Fertil* 2010;38:536–40.
- 6-Vanderzwalmen P, Zech N, Prapas Y et al. Support fermé : une réalité clinique pour vitrifier en conditions aseptiques les ovocytes et embryons. *Gynecol Obstet Fertil* 2010;38:541–46.
- 7-Vanderzwalmen P, Lejeune B, Stecher A, Zech N, Delval A, Zech H. Survival of day 3 and day 5 embryos following vitrification in aseptic and non-aseptic conditions: a prospective randomized analysis. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl):S175.
- 8- Mavrides A, Morroll D. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? *Reprod Nutr Dev* 2002;42:73–80.
- 9- Yokota Y, Sato S, Yokota M, Yokota H, Araki Y. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil Steril* 2001;75:1027–9.
- 10- Takahashi K, Mukaida T, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 2005;84:88–92.
- 11- Sifer C, Sermondade N, Dupont C et al. Issue de la vitrification des embryons précoces versus congélation lente. Rapport de la première naissance française. *Gynecol Obstet Fertil* 2012;40:158–61.
- 12-Shaw J, Jones G. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod* 2003;9:583–605.
- 13-Wikland M, Hardarson T, Hillensjo T et al. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2010;25:1699–707.
- 14-Sipe C, Pelts EJ, Matthews JM et al. After more than 2300 transferred vitrified blastocysts: what is the verdict. *ESHRE Rome* 2010;i13:0–032.
- 15-Lieberman J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker M. Recent developments in human oocytes, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed* 2003;7:623–33.

CONCLUSION

Peut-on envisager la vitrification comme une alternative à la congélation lente ?

Il est possible que dans le futur la vitrification s'impose comme étant la technique la plus favorable pour la cryoconservation des embryons. Toutefois, malgré les résultats prometteurs obtenus à ce jour, la méthodologie devra être adaptée en fonction des différents stades de développement embryonnaire. En effet, il est indispensable pour chaque stade, caractérisé en outre par un rapport surface/volume et par une perméabilité membranaire spécifique, de trouver la balance entre la pénétration minimale de cryoprotecteur dans la cellule et la vitesse de refroidissement et de réchauffement qui permet d'obtenir un taux de survie maximal sans induire un effet toxique.