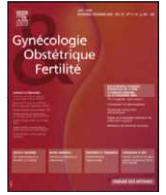




Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

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



1 Quinzièmes Journées nationales de la Fédération française d'étude de la reproduction (Paris, 6-8 octobre 2010)
2
3 La vitrification et l'utilisation de concentrations élevées en cryoprotecteurs :
4 ceci justifie-t-il la préférence pour la congélation lente ? ☆

5 *Vitrification and the use of high concentrations of cryoprotectants: Is it a justified argument to*
6 *prefer slow freezing?*

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

8 ^a IVF Centers Prof. Zech, Bregenz, Autriche

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

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

11 ^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 xxx

Mots clés :

Vitrification

État vitrifiant

Cryoprotecteur

Keywords:

Vitrification

Vitrified state

Cryoprotectant

R É S U M É

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 de PMA. 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.

A B S T R A C T

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.

12
13 **1. Introduction**

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

17 induisant une élévation de la viscosité du milieu et en appliquant 17
18 des vitesses de refroidissement et de réchauffement suffisamment 18
19 rapides pour garantir cet état vitreux. 19

20 Plusieurs études concluent à la supériorité de la vitrification en 20
21 termes de survie post-réchauffement et de grossesses ainsi qu'une 21
22 absence de risques accrus en termes de malformations (1,3 %) 22
23 comparativement aux enfants conçus spontanément ou après 23
24 fécondation in vitro (FIV) [1,2]. 24

25 Malgré tout, il subsiste encore des réticences de certains acteurs 25
26 du monde médical et scientifique pour introduire cette technique 26
27 comme moyen de cryopréservation des ovocytes et embryons dans 27
28 le cadre d'un programme d'assistance médicale à la procréation 28
29 (AMP). 29

* 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).

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

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

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

43 Au cours de l'étape finale précédant l'immersion dans l'azote
44 liquide (LN2), les ovocytes ou embryons sont exposés à la solution
45 vitrifiante de concentration très élevée. Il se produit instantané-
46 ment une déshydratation avec concentration des protéines et sels
47 intracellulaires ainsi que des CPs ayant pénétrés dans la cellule
48 durant les premières phases d'exposition. C'est cette augmenta-
49 tion des concentrations en sels, protéines et CPs qui permet de
50 répondre aux contraintes liées aux conditions de la formation d'un
51 état vitrifiant intracellulaire. L'absence de cristaux extracellu-
52 laires est, quant-à elle, obtenue grâce à l'enrobage des ovocytes ou
53 des embryons par cette solution hautement concentrée qui
54 correspond à la concentration minimale en CPs permettant
55 d'obtenir un état vitrifiant au refroidissement et de le maintenir
56 au réchauffement pour des vitesses de refroidissement et
57 réchauffement ad hoc.

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

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

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

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

75 La deuxième expérience a pour but de comparer les concentra-
76 tions intracellulaires en CPs lors d'un processus de vitrification ou
77 de congélation lente de zygotes ou de blastocystes.

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

82 2. Matériel et méthodes

83 2.1. Stimulation et récolte des embryons de souris FVB/N au stade 84 zygote et leur mise en culture jusqu'au stade blastocyste

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

2.2. Vitrification

94 La méthode de vitrification décrite est celle employée en
95 routine pour la cryopréservation de zygotes et blastocystes de
96 souris transgéniques et qui est la base de notre protocole de
97 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 (= nVS½) ;
- 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, « Héli-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

exposition à des solutions hyperosmotiques consiste à exposer celui-ci à des solutions de sucrose de différentes concentrations. En fonction de la différence osmotique entre le compartiment intracellulaire et la concentration extracellulaire en sucrose, le volume cellulaire va augmenter, se contracter, ou finalement ce que nous recherchons, ne se modifiera pas. Aucune variation du volume signifie que la solution de sucrose est iso-osmotique avec le compartiment intracellulaire. La concentration du sucrose étant déterminée et connue, il est par conséquent possible d'en déduire l'osmolarité intracellulaire. Pour ce faire, une analyse cinématographique a été effectuée et des photos sont prises à intervalle de dix secondes au cours des différentes expositions aux solutions de CP. Une analyse morphométrique des zygotes permet de suivre l'évolution de la surface - volume de ceux-ci tout en déplaçant les embryons d'une goutte de CPs à l'autre.

En pratique, des gouttes de solutions de CP utilisées pour la vitrification et des gouttes de sucrose à différentes concentrations sont alignées dans une boîte de Pétri. Afin de garantir la focale des zygotes et pouvoir les photographier facilement lorsqu'ils transitent d'une solution à l'autre, les embryons sont fixés avec une pipette de maintien. Une telle approche nous permet d'observer les variations de volume du zygote lors des phases de déshydratation et pénétration des CPs. Notre étude cinématographique concerne deux protocoles d'exposition aux CPs qui sont à la base respectivement de la méthode de vitrification ultrarapide en système de contention « ouvert » [5] et de la vitrification aseptique en système « fermé » [3] Un minimum de 3 zygotes sont analysés pour chaque mesure.

2.4.2. Deuxième étude : comparaison des concentrations intracellulaires après vitrification ou congélation lente

Objectif : le but de l'étude est d'analyser le comportement de zygotes issus de vitrification ou de congélation lente lorsqu'ils sont directement dilués dans une solution isotonique ou à différentes solutions de sucrose de concentrations croissantes. Le taux de lyse dans les différentes solutions sera le reflet de la concentration intracellulaire en CPs lors d'une congélation lente ou d'une vitrification.

Pour ce faire, les zygotes issus des deux protocoles de cryopréservation vont être exposés après réchauffement à une solution isotonique ou de sucrose.

Le pourcentage de survie à ce choc osmotique est observé et les embryons non lysés sont placés en culture en milieu M16 sous une atmosphère de 5 % CO₂ dans l'air.

2.4.3. Troisième étude : vitrification lente et existence d'un état vitrifiant intracellulaire

Objectif : lors d'une congélation lente, une déshydratation progressive a lieu. Elle sera optimale, si aucun foyer de cristallisation ne se forme au cours du refroidissement, sachant que la présence de cristaux est incompatible avec la survie embryonnaire. Le but de cette étude est de vérifier si au cours d'une congélation lente, la survie embryonnaire est fonction de la température à laquelle les embryons sont plongés dans LN2.

Dans un premier groupe, une descente en température de 0,3 °C par minute est réalisée jusque -30 °C, -32 °C, -34 °C et -36 °C avant de les plonger dans LN2. Dans un deuxième groupe, une descente à 0,3 °C par minute jusque -30 °C est programmée suivie d'un refroidissement à 4 °C par minute jusque -50 °C, -60 °C et -70 °C avant de les plonger dans LN2.

3. Résultats

La Fig. 1 représente l'évolution volumique de zygotes de souris exposés par étapes à trois solutions différentes de CP (nVS_{1/2} : dix minutes, nVS₁ : quatre minutes, VS₂ : 90 secondes). Au cours de ces étapes préparatoires au refroidissement, des phases de déshydratation et de regonflement cellulaire correspondent respectivement à la sortie d'eau et à l'entrée des CP perméables. Ces modifications du volume cellulaire sont quantifiées par analyse cinématographique.

Dans cet exemple précis, nous observons que la cellule exposée aux différentes solutions de CPs, réagit différemment en fonction des concentrations en sucrose testées. Après exposition à différentes concentration en sucrose, on observe que le volume du zygote après avoir été exposé à une solution de sucrose de l'ordre de 2,2 M ne subit pas de variation significative. Cette absence de variation volumique est révélatrice d'une égalité osmotique entre les compartiments intra et extracellulaires. Une telle approche nous permet de déterminer la concentration intracellulaire en CPs présente dans un zygote juste avant qu'il ne soit plongé dans LN2 en fonction des protocoles de vitrification appliqués en routine (Tableau 1) Nous observons que les

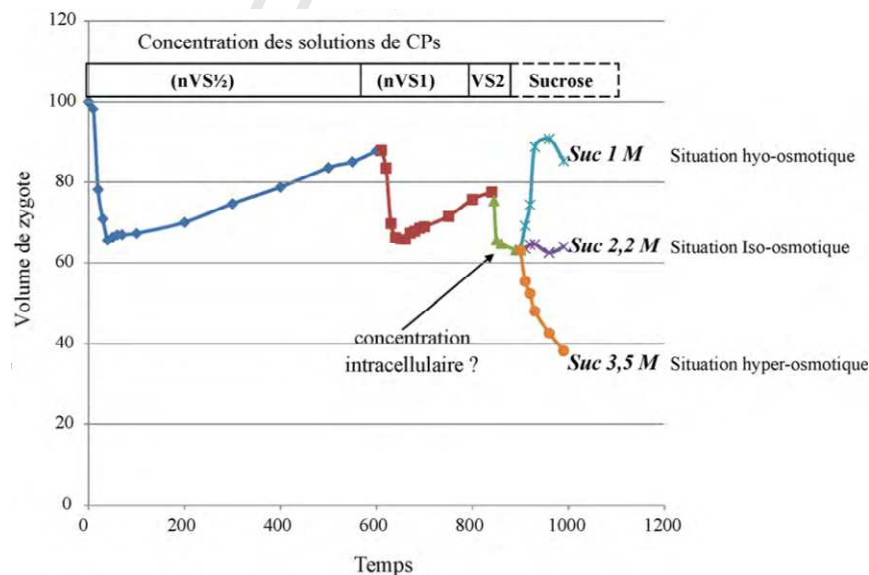


Fig. 1. Détermination de la concentration intracellulaire après exposition aux différentes solutions de CPs.

Tableau 1

Détermination de la concentration intracellulaire présente dans le zygote de souris au moment où il est plongé dans LN2 et en fonction de deux différents protocoles d'exposition aux CPs (systèmes « ouvert » et « fermé »).

| Contention et vitesse | (nVS1/2) (min) | (nVS1) (min) | (VS2) (sec) | Molarité iso-osmotique (M) | Osmolarité mOsm |
|-------------------------------|----------------|--------------|-------------|----------------------------|-----------------|
| « ouvert » > 20,000 °C/min | – | 3 | 45 – 60 | 0,8 – 1 | ~900 – 1000 |
| « fermé » < 2000 °C/min | 3 – 5 | 3 | 45 – 60 | 1,7 – 1,9 | ~1750 – 2000 |

Trois analyses par protocole. (nVS1/2) : 5 % DMSO-5 % éthylène Glycol ; (nVS1) : 10 % DMSO-10 % éthylène Glycol ; (VS2) : 20 % DMSO-120 % éthylène Glycol.

Tableau 2

Pourcentages de zygotes se développant jusqu'au stade blastocyste après dilution directe dans du milieu de culture ou dans du sucrose à différentes concentrations après avoir été vitrifiés ou congelés lentement.

| Dilution en | Congélation lente : 0,3 °C/min jusqu'à -36 °C | Vitrification en système « ouvert » |
|--|---|--|
| Sucrose 0M (directement dans le M2) | 30 % (12/40) | 74 % (40/54) |
| Sucrose 0,33 M | 35 % (14/40) | 90 % (36/40) |
| Sucrose 0,5 M | | 96 % (44/46) |
| Sucrose 1 M | 75 % (30/40) | |

Quatre répliques pour chaque groupe.

osmolarités intracellulaires sont bien inférieures aux solutions employées. Les valeurs osmotiques varient en fonction des protocoles utilisant un système « ouvert » ou « fermé » Ces valeurs augmentent lorsque le protocole d'exposition est allongé pour pallier à une diminution de vitesse (système fermé). Ici encore, nous observons que les osmolarités intracellulaires sont bien inférieures aux solutions employées, même pour des systèmes fermés (Fig. 1).

Les résultats de la deuxième étude (Tableau 2) montrent qu'une dilution directe des CPs par lavage des embryons dans du milieu de culture M2 sans sucrose (solution isotonique) n'induit que peu de lyse pour autant que les zygotes aient été exposés à une séquence complète de vitrification. Par contre, pour les zygotes soumis à une congélation lente, le taux de lyse de zygotes plongés directement dans du milieu de culture sans sucrose est significativement plus élevé. Dans ce cas, la concentration en sucrose doit atteindre 1 M pour qu'une entrée rapide d'eau soit contrecarrée, indiquant une concentration assez élevée en CPs.

Les résultats de la troisième étude (Tableau 3) mettent en évidence que la survie des zygotes issus d'un programme de congélation lente est étroitement liée au degré de déshydratation de la cellule, reflétant l'apparition d'un état vitreux intracellulaire.

Lors d'un refroidissement à 0,3 °C par minute, la survie devient maximale lorsque les zygotes sont plongés dans LN2 à partir de -34 °C. Si le refroidissement à 0,3 °C par minute est interrompu à

Tableau 3

Taux de zygotes se développant jusqu'au stade de blastocyste en fonction de différents programmes de congélation lente descendant jusqu'à différentes températures avant de plonger les embryons dans LN2.

| -0,3 °C/min jusque | Taux de blastocystes | -0,3 °C/min jusque -30 °C suivi de -4 °C/min jusque | Taux de blastocystes |
|-----------------------|-------------------------|--|-------------------------|
| -30 °C | 26 % (28/107) a | -30 °C | 23 % (26/112) a1 |
| -32 °C | 45 % (50/110) b | -50 °C | 53 % (60/113) b1 |
| -34 °C | 68 % (75/110) c | -60 °C | 59 % (72/121) c1 |
| -36 °C | 74 % (81/110) d | -70 °C | 76 % (88/116) d1 |

a1 – d1 : $p < 0,001$; b1 – d1 : $p < 0,002$. Quatre répliques pour chaque groupe.

-30 °C et poursuit à une vitesse de 4 °C par minute, une survie maximale est obtenue à partir de -70 °C.

4. Discussion

L'utilisation de concentrations élevées en 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 ?

L'analyse des variations de volume du zygote soumis à divers protocoles d'exposition aux CPs, nous a permis de déterminer la concentration iso-osmotique en sucrose. La détermination de la concentration iso-osmolaire nous permet de conclure que la concentration intracellulaire en CPs des zygotes obtenue après des protocoles d'exposition court ou long est respectivement de l'ordre de 0,8 M (~1000 mosmol) et 1,9 M (~2000 mosmol).

Le protocole utilisé pour vitrifier en support « fermé » les blastocystes humains et qui est représenté sur la Fig. 1, nous permet d'observer que la concentration en sucrose est de l'ordre de 2,2 M. Ces concentrations étant de loin inférieures à la concentration totale du VS2.

La question essentielle à résoudre consistait à savoir quelle était la concentration intracellulaire en CPs présente dans les cellules après vitrification par rapport aux cellules soumises à une congélation lente. Les résultats de la seconde étude montrent que la concentration intracellulaire en CPs de nos zygotes soumis à un programme de vitrification est inférieure à celle présente dans les cellules lors d'un programme de congélation lente. En effet, après congélation lente, la survie des zygotes plongés directement dans du milieu de culture ou de sucrose à faible concentration (max 0,33 M) est significativement inférieure aux zygotes vitrifiés et dilués dans les mêmes conditions. Cette lyse est liée à l'entrée rapide d'eau secondaire à un choc osmotique important, reflétant une concentration intracellulaire élevée en CPs. En revanche, la faible lyse cellulaire observée pour les zygotes vitrifiés est représentatif d'une osmolarité intracellulaire assez faible pour empêcher la lyse des cellules par entrée excessive d'eau. Cette étude confirme les résultats obtenus avec des blastocystes humains vitrifiés ou un taux de survie acceptable était obtenu après dilution directe dans du PBS [6]. De telles observations, en parallèle avec celle de notre troisième étude montrant l'importance de la température de fin de programme de refroidissement lent, renforcent l'idée que la formation d'un état intracellulaire vitreux est obtenue lors d'une congélation lente. En effet, ce protocole consiste à refroidir lentement (< 1 °C par minute) les cellules et à induire la formation de cristaux de glace dans le compartiment extracellulaire. L'augmentation, au cours du refroidissement, de la quantité d'eau cristallisée extracellulaire va de paire avec une augmentation de la concentration extracellulaire en solutés. Ceci a pour conséquence de déshydrater l'embryon en vue

de respecter l'équilibre osmotique. Il en résulte une augmentation des concentrations intracellulaires en solutés. Une déshydratation suffisante et optimale, c'est-à-dire sans « effet de solution excessif » ou « salage », empêchera une cristallisation intracellulaire à cause d'une concentration appropriée en solutés, concentration qui permettra la solidification par vitrification de la solution lors de son immersion dans LN2.

La survie cellulaire n'est pas possible en présence de cristaux intracellulaires [7]. Ce qui revient à dire si les embryons survivent à la méthode de congélation lente, c'est parce que l'effet de solution lié à la descente progressive en température entraîne des concentrations intracellulaires compatibles avec un état vitreux. Or, le type de support utilisé en congélation lente ne permet pas de réchauffer de manière ultrarapide ($\pm 1000^\circ\text{C}$ par minute). Les concentrations intracellulaires en CPs qui vont induire un état vitreux et surtout le maintenir dans de telles conditions de réchauffement seront par définition bien plus élevées que celles nécessaires lors d'une vitrification directe.

Les craintes liées à la cryopréservation par la vitrification sont secondaires à l'utilisation de concentrations élevées en CPs. Ces craintes sont encore exacerbées par le fait que les embryologistes doivent manipuler les ovocytes et/ou embryons dans des milieux très visqueux tels que VS2 potentiellement toxique si les durées d'exposition ne sont pas respectées. En effet, cette dernière étape est considérée comme cruciale et amplifie le stress du biologiste car le matériel biologique ne doit rester que peu de temps dans VS2. Or en observant la Fig. 1, nous observons que dans le VS2 le volume reste stable.

Finalement, notre étude cinématographique montre que lorsque les zygotes sont exposés à VS2, seule une phase de déshydratation est observée. En conséquence, il est impératif de bien rincer le matériel biologique dans VS2 afin que chaque embryon soit correctement englué dans une gaine vitrifiante. Ensuite, il faut les déposer sur le support de contention avant insertion dans la paille de protection et immersion dans LN2. Toutes ces opérations doivent être réalisées sans contrainte de temps générateur de stress et problèmes techniques.

En résumé, il n'est absolument pas raisonnable de penser qu'il coexiste deux processus permettant à une cellule de survivre aux conditions extrêmes liées à la cryopréservation dans LN2. Puisque la présence de cristaux intracellulaires est synonyme d'altérations mécaniques létales, cela revient à dire qu'une cellule cryopréservée par les méthodes de congélation lente ou de vitrification ne survit que si son cytoplasme a atteint les conditions physiques autorisant

la solidification en un état vitreux. L'apparition de cet état vitreux intracellulaire et son maintien durant le réchauffement sont des conditions sine qua non de la survie cellulaire.

5. Conclusion

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). Nous avons pu montrer que la concentration intracellulaire en CPs d'un embryon vitrifié est inférieure à la concentration intracellulaire en CPs d'un embryon cryopréservé 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 cryopréservent dès lors par le biais de la vitrification !

Conflit d'intérêt

Les auteurs ne déclarent pas de conflits d'intérêts.

Références

- [1] Wikland M, Hardarson T, Hillensjö T, Westin C, Westlander G, Wood M, et al. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2010 [Epub ahead of print].
- [2] Chian R, Huang J, Tan S, et al. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *RBM online* 2008;16:608-10.
- [3] Vanderzwalmen P, Ectors F, Grobet L, Prapas Y, Panagiotidis Y, Vanderzwalmen S, et al. Development of an aseptic vitrification technique: application to blastocysts originating from infertile patients, egg donors and after in vitro maturation. *RBM online* 2009;19:700-7.
- [4] Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007;67:81-9.
- [5] Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche. et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 2003;18:1504-11.
- [6] Vansteenberghe A, Vanderzwalmen P, Vastersaegher C, Pauwels P. Does high concentration of cryoprotectant during vitrification of blastocysts present any risks? *Hum Reprod* 2007;22:P387.
- [7] Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963;47:347-69.