

LA CONGÉLATION DANS TOUS SES ÉTATS
« Du gamète au blastocyste, et de l'embryon à l'enfant »

Journée organisée par les groupes d'intérêt en Biologie de la Reproduction et en
Assistance Médicale à la Procréation
de la
Société de Médecine de la Reproduction
Paris le 28 Janvier 2005

Introduction de la Journée

JF Velez de la Calle (*Brest*) et P Cohen-Bacrie (*Paris*)

Parmi toutes les techniques afférentes à l'AMP, la congélation des gamètes et d'embryons, constitue en France, celle où les plus grandes divergences et différences existent.

En effet, dans notre pays, il n'y a aucun consensus en la matière:

Quelle cellule et à quel stade congeler ?

Quel type de cryoprotecteur et à quelle vitesse congeler ?

Quelles paillettes devons-nous utiliser ?

Quel type de congélateur utiliser ? Avec cristallisation manuelle ou automatique ?

Quel protocole de décongélation utiliser ? etc. etc.

Toutes ces différences, en plus de l'hétérogénéité de notre population de patientes et des protocoles cliniques, font que toute exploitation statistique de nos résultats soit non seulement hasardeuse mais plutôt téméraire.

Au sein des groupes d'intérêt en Biologie de la Reproduction et en Assistance Médicale à la Procréation de la SMR, nous avons voulu faire le point sur la congélation, non seulement sur ce qui est acquis, mais aussi, sur ce qui est à acquérir. Pour cela, nous avons fait appel à des spécialistes étrangers reconnus, qui ont tous un commun dénominateur vis à vis de la France, c'est-à-dire des résultats assez homogènes et reproductibles.

Nous avons donc programmé le tour de la question concernant les gamètes et les embryons, non seulement à différents stades, mais aussi dans des différentes conditions de culture, des milieux, voire, de manipulation.

Pour ce qui est de la congélation de l'ovocyte immature, technique d'actualité et non plus du futur, il nous a semblé important dans cette journée d'introduire un chapitre sur la maturation *in vitro*.

Comme nous le verrons par la suite, la congélation n'est nullement un sujet 100% biologique. En effet, les résultats nous permettant d'améliorer la technique reposent également sur le plan clinique avec, éventuellement, les indications, mais surtout sur la préparation de l'endomètre pour l'accueil de l'embryon. Ce volet sera aussi discuté dans un contexte moins pathologique lors de l'évaluation de la congélation dans un programme de don d'ovocytes.

Parmi les indications, nous aurons le plaisir de partager grâce à nos collègues belges, une nouveauté mondiale sur la congélation réussie du fragment ovarien, avec la naissance de la première fille par cette technique et la mise en route d'une deuxième grossesse.

Finalement, nous évoquons ci-dessus notre spécificité française en matière des résultats. Nous avons voulu au sein de la Société de Médecine de la Reproduction, souligner cette spécificité en matière de législation et suivi des enfants issus de la congélation, avec l'organisation de ce type de journée, car nous savons, que c'est un devoir et une obligation pour nous tous praticiens de l'AMP, que de rassurer nos patients non seulement sur un plan technique, mais avant tout éthique.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Cryobiologie microscopique des gamètes et des embryons humains.

M Jondet (Paris)

La cryomicroscopie permet de vérifier si des lésions cellulaires se produisent durant la congélation ou durant la décongélation. Les lésions les plus fréquentes pour l'ovocyte ou l'embryon sont une augmentation du volume cytoplasmique, une altération de la cellule ou une écorchure de la zone pellucide, et pour le spermatozoïde, une baisse du pourcentage de spermatozoïdes mobiles, et souvent un enroulement ou un enflement du flagelle à différents niveaux.

Le cryomicroscope

Il associe un système optique à un système d'enregistrement vidéo et photo, une platine réfrigérante et chauffante avec régulation de température, un circuit d'azote liquide, et un thermocouple proche de l'échantillon (3/10^{ème} mm).

Les problèmes de la cryobiologie

Ils sont liés à la taille des éléments par rapport au degré d'hydratation, aux cryoprotecteurs (CP) et à l'équilibre osmotique, à l'influence de la température de surfusion (car il est fondamental d'induire la cristallisation), à la congélation puis au dégel. Dans le domaine de la reproduction, nous sommes en présence de deux cellules aux tailles extrêmes, l'ovocyte (100 µ) et le spermatozoïde (10 µ).

Effets mécaniques: Pour l'ovocyte et l'embryon, on observe l'effet ballon au moment du dégel, c'est-à-dire le gonflement et des écorchures de la ZP, mais ces déformations sont réversibles. Pour le spermatozoïde, on observe la dissociation de la tête et du flagelle.

Effets osmotiques: Ils peuvent se produire au moment de l'adjonction du CP, pendant l'équilibration, pendant la congélation ou durant le dégel. Pour le spermatozoïde, l'enroulement du flagelle peut être dû à une mauvaise homogénéisation au dégel, la cellule est alors en contact avec des solutions hypo puis hyper osmotiques. Pour l'embryon, à -35°C, la cassure de la glace a des effets mécaniques, et à -145°C on n'obtient plus de cristallisation intracellulaire. Pendant la décongélation, on a une entrée d'eau qui provoque un gonflement.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Conclusion : Les trois écueils à éviter sont les effets mécaniques en particulier la compression (surtout pour les grosses cellules), la cristallisation intracellulaire, les effets osmotiques associés aux problèmes d'équilibration.

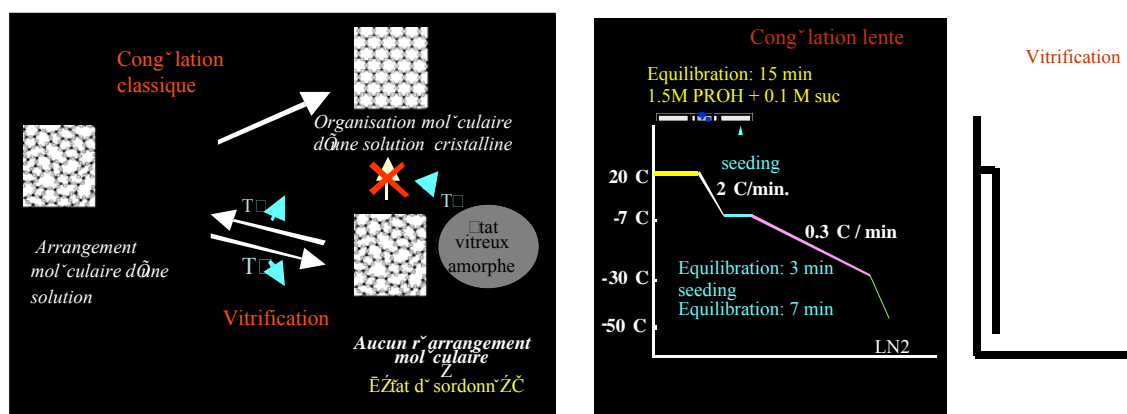
Vitrification de l'embryon précoce et du blastocyste.

P Vanderzwalmen (Bruxelles)

La survie embryonnaire est fonction de la vitesse de refroidissement : si le temps de congélation est trop court, il y a cristallisation extracellulaire avec déshydratation cellulaire excessive, s'il est trop long, il y a cristallisation intracellulaire. Il faut donc trouver la vitesse optimale pour laquelle les mécanismes indésirables seront moindres (0,3-0,5°/min pour l'ovocyte). Une alternative est la vitrification.

La vitrification

C'est un processus par lequel un liquide se solidifie sans formation de cristaux de glace grâce à une importante viscosité. On évite ainsi les altérations mécaniques et le stress osmotique.



Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Pour obtenir un état vitrifiant, les molécules ne doivent pas se ré-arranger en structure cristalline au refroidissement ni au réchauffement. Il faut donc une concentration élevée en CP perméables, 5 à 7 M contre 1.5 M pour la congélation lente. Les CP perméables de faibles poids moléculaires sont l'éthylène glycol (EG), le DMSO, l'érythritol ; les non-perméables de faibles poids moléculaires sont le sucrose, le tréhalose, et de poids moléculaires élevés le Ficoll, le PEG. Ces dernières molécules enveloppent l'embryon dans une gaine protectrice.

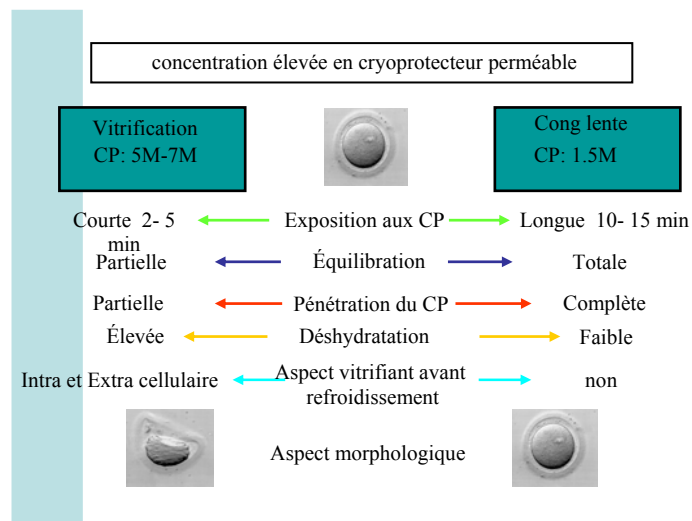
L'exposition aux CP doit se faire en deux étapes :

1^{ère} phase: déshydratation pour induire l'état vitrifiant intracellulaire : 15-20% de CP, 3500 mOsm, temps d'exposition de 1 à 4 min entraînant une diminution du volume due à la libération d'eau. Quand l'équilibre osmotique est atteint, il peut y avoir pénétration partielle du CP.

2^{ème} phase: enrobage des cellules dans un mélange vitrifiant : 30-40% de CP + macromolécules + sucrose - 6770 mOsm – temps d'exposition de 30 sec entraînant une déshydratation très élevée. La cellule est plongée dans l'azote liquide quand elle est fortement déshydratée.

Deux conditions pour réduire la formation de cristaux :

1 -Concentration élevée en CP perméables



Les désavantages de la congélation lente sont la formation de cristaux extracellulaires et la lenteur du processus ; les désavantages de la vitrification sont la déshydratation excessive et la toxicité des fortes concentrations de CP. La déshydratation excessive peut avoir des conséquences graves : en touchant à l'eau constitutive, elle peut induire des altérations et des dégâts membranaires, une précipitation des protéines et des complexes lioprotéiques ; en cristallisant des sels tampons, elle peut entraîner des variations de pH qui à leur tour induisent une dénaturation des protéines ; elle augmente la concentration en ions (Ca^{2+} , PO_4) induisant une toxicité.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

2 - Vitesses de refroidissement et de réchauffement très rapides

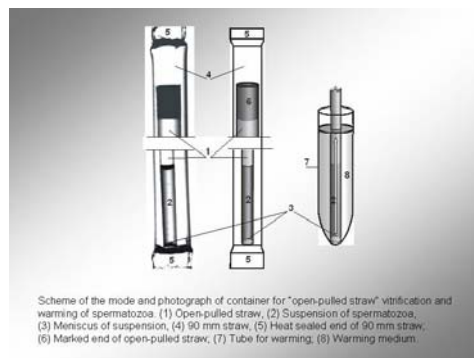
Pour réduire le gradient thermique, la taille de l'échantillon à congeler doit être réduite (μl) et le support doit favoriser au mieux le contact de l'échantillon avec l'azote liquide. Les supports disponibles sont les paillettes à paroi fine (open-pulled straw ; flexible-denuding pipette) ou les supports permettant le contact direct du CP avec l'azote (grille de microscopie électronique, cryoloop, hemi-straw system, cryotop, solid surface vitrification).

De 1984 à 2004, 402 articles ont été publiés sur la vitrification des embryons, plus de 75 % concernent des études sur l'animal, les publications concernant l'embryon humain sont donc beaucoup plus rares et concernent majoritairement la vitrification au stade blastocyste.

Système pour la vitrification du spermatozoïde, de l'ovocyte et de l'embryon humain.

V Isachenko (Bonn)

L'azote liquide pouvant être contaminée par des microorganismes, il est très important d'éviter le contact direct du milieu de vitrification avec elle. Notre technique permet de vitrifier de façon aseptique : il s'agit d'un container utilisable aussi bien pour les spermatozoïdes que les ovocytes. Il comprend une « Super Open Pulled Straw » (avec une petite quantité de milieu de vitrification (0,1 μl)) incluse dans une paillette plus grande (0.5 ml) elle même scellée à chaud.



On plonge ce container dans l'azote liquide. Les vitesses de congélation sont de $400^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et les vitesses de réchauffement sont aussi très rapides, suffisantes pour la vitrification.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Débat :

Q : L'azote liquide pourrait-elle être stérilisée ?

R : Oui mais cela reviendrait beaucoup trop cher. C'est réalisé pour de la très haute technologie.

Q : La vitrification ne pourra donc jamais être réalisée en France, dans les labo de FIV.

R : Le système de Isachenko qui évite le contact peut être une solution.

Une équipe australienne a aussi mis au point un système efficace, déjà sur le marché.

Q : A-t-on évalué le risque mutagène des fortes concentrations de CP chez l'animal ?

R : Non, mais lors de la vitrification, l'entrée de CP dans la cellule est moins importante que lors de la congélation lente.

CONGELATION ET ASPECTS CLINIQUES

Indications cliniques et préparation de l'endomètre.

A Hazout (Paris)

Les indications classiques pour la congélation :

- Embryons surnuméraires après FIV
- Les utérus hypoplasiques ou mal formés imposant le transfert d'un seul embryon
- Les hyperstimulations ovariennes sans projet de transfert embryonnaire "frais"
- Les endomètres inadéquats en cours de stimulation
- Les programmes de don d'ovocytes ou d'embryons
- Avant chimiothérapie ou radiothérapie pour cancer ou leucémie.

Résultats européens

Si l'on considère le pourcentage de bébés obtenus pour 100 embryons décongelés, les résultats sont vraiment très faibles.

Stade des embryons au moment de la congélation	% de bébés par 100 embryons décongelés	
	Résultats internationaux	Clinique Eylau
2PN	7,4 (Al Hasani et coll.) 2,0 (Senn et coll.) 2,8 (Kattera et coll.)	4

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

2 Cellules	1,4 (Van der Elst et coll.) 4,5 (Kattera et coll.)	4
Blastocyste	10,9 après coculture, 11 après culture (Behr et coll., 2002) 8 après vitrification (Van der Zwalmen et coll., 2002) 5 après séquentielle et 10,9 après co-culture (Ménézo et coll., 2004)	6

Résultats outre atlantique

Le taux est en moyenne de 24 % en 1998, et 33 % en 1999 (Tucker et coll., 2001).

Peut-on améliorer nos résultats en Europe, et sinon, faut-il continuer à congeler ? Faut-il améliorer la sélection des embryons ? Le taux de survie est nettement amélioré lorsqu'on congèle des embryons de bonne qualité, il passe de 55 à 85 % en moyenne. Faut-il une meilleure prise en charge clinique ?

Préparation de l'endomètre

Il faut faire un bilan préalable pour évaluer l'endomètre (hystérocopie, écho-doppler) puis choisir le traitement en fonction de ce bilan.

Cycles spontanés: Chez les femmes jeunes uniquement et normo-ovulantes, avec critère principal d'infertilité masculine. Faire un monitoring écho. À J10, s'il y a un follicule de 16 mm, faire un doppler folliculaire, et le doppler endométrial doit être favorable sinon échec.

Cycles stimulés: Administrer la FSHrec à partir de J5 seulement ; vérifier l'aspect échographique de l'utérus qui doit être favorable, sinon la tentative est vouée à l'échec.

Cycles substitués: On maîtrise mieux l'endomètre dans ce contexte-là. On désensibilise l'ovaire avec un agoniste du GnRH à J20, puis on fait un contrôle écho-hormonal à J2, suivi d'un traitement œstrogénique de 2 à 4 mg pendant 12 jours, accompagné d'un vasodilatateur selon les antécédents, puis hCG pour forcer la sécrétion de LH. On fait des contrôles échographiques et doppler et enfin introduction d'un progestatif et des traitements complémentaires avant transfert. Dans ce cas, le stade de l'embryon n'est pas fondamental.

Pour les traitements complémentaires : hCG en phase œstrogénique pour stimuler la production de LIF et inhiber la production d'IL6 ; GnRHa en phase œstro-progestative le lendemain du transfert de blastocyste ou 3 jours après le transfert d'un embryon. Ceci a une action directe sur l'embryon et favorise le développement embryonnaire précoce (Tesarik et coll., 2004).

Débat :

Q : Doit-on continuer à congeler autant d'embryons ?

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

R : Il faut reconsidérer les protocoles de stimulation (moins de stimulation) et envisager le transfert d'un seul embryon. Mais lequel ?

R : La congélation a été modifiée depuis des années, les milieux de congélation sont standardisés maintenant.

Q : Est-ce que le supplément œstrogénique ne devrait pas être plus élevé ? Ne devrait-il pas être fonction de la muqueuse utérine ?

R : Non, il faut la même dose du début à la fin comme les australiens. Plus de 4mg d'œstradiol ne sert à rien.

Q : Le cycle substitué est vraiment lourd pour la patiente, et idéal pour le clinicien. Est-il vraiment mieux ?

R : Oui, il semble donner de meilleur résultat que le spontané.

Q : Si on regarde la congélation depuis le début, en fait nous avons de meilleurs résultats au début. On recueille de plus en plus d'ovocytes, mais quelle est leur qualité ? Il faut revenir aux cycles spontanés. D'autant qu'on congèle actuellement beaucoup d'embryons dont on ne profite pas vraiment.

R : Oui, mais beaucoup de femmes qui viennent nous voir ont en fait de mauvais cycles spontanés.

Congélation du fragment ovarien.

J Donnez (Bruxelles)

Indications pour la congélation de fragments ovariens

Le nombre de cancers est en augmentation et en particulier chez les femmes jeunes. Heureusement, le taux de survie après traitement est aussi en augmentation. En 2010, 1 adulte sur 250 aura survécu à un cancer. Or la chimiothérapie et la radiothérapie, seules ou associées, sont très destructrices de la réserve ovarienne. Pour ces patientes, la cryopréservation de tissu ovarien est le seul espoir de grossesses après recouvrement de la santé.

Biopsie, congélation et greffe

Chez la souris : Les premiers essais ont consisté à congeler des fragments de tissu humain et à les greffer chez la souris. La greffe sous le péritoine donne de meilleurs résultats, en particulier pour la vascularisation, que la greffe en sous-cutanée. L'addition de VGEF n'améliore pas la néo-vascularisation des greffons. Ces résultats ont montré qu'il était possible de congeler et de greffer du tissu ovarien humain avec succès. Seuls les follicules primordiaux résistent bien à la congélation.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Chez la femme : La greffe est orthotopique (près de l'ovaire) ou hétérotopique (dans l'avant-bras par exemple). Cette dernière est un mauvais site pour la revascularisation.

Le tissu est prélevé par laparoscopie : on réalise une biopsie de surface pour enlever le cortex ovarien où sont les follicules primordiaux. On dissèque ce fragment en petits cubes (2,5-3 mm de côté) ou en bandelettes de 3 mm de large sur 2 cm de long que l'on plonge dans du milieu de Leibovitz L-15 glacé.

Pour la congélation, on utilise le DMSO 1,5 M comme CP, de l'albumine humaine (4 mg/ml) et un protocole lent et un cryotube que l'on plonge ensuite dans l'azote liquide. Nous avons aujourd'hui des prélèvements de 160 patientes.

Historique de la 1^{ère} transplantation réussie

Il s'agit d'une patiente souffrant d'un Hodgkin's qui, en Juillet 1997, a subi une biopsie ovarienne. D'Août 97 à Février 98, elle a été sous chimiothérapie puis radiothérapie. De 1998 à 2000, elle est mise sous Trisequens pour cause d'aménorrhée (FSH>80). En 2001, après l'arrêt du traitement, elle a un saignement, avec une FSH de 11,4 et une progesterone de 9,. Puis elle présente à nouveau une aménorrhée avec des niveaux élevés de FSH. L'autogreffe est réalisée en 2003. Quatre mois après la transplantation une structure folliculaire est visible, une biopsie est réalisée et, en histologie, on retrouve des cellules de la granulosa positive pour l'inhibine. La survie de follicules primordiaux après congélation puis autogreffe est donc prouvée. Neuf mois après l'implantation du greffon, on observe une montée importante de FSH puis une chute. À l'échographie, on voit un follicule de 20 mm puis un pic de LH suivi d'une aménorrhée gravidique. Neuf mois après c'est la naissance de Tamara.

Il faut retenir qu'il faut 5 à 6 mois pour que les follicules primordiaux se développent jusqu'au stade antral ce qui correspond aux données de A Gougeon.

Historique de la 2^{ème} transplantation :

Il s'agit d'une femme de 26 ans souffrant d'une drépanocytose. On lui a prélevé un fragment ovarien que l'on a congelé avant sa thérapie. Puis on lui a replacé. Elle a eu ses premières règles la semaine dernière. Il a fallu 4 mois là aussi pour observer une chute de la FSH suivie d'une remontée accompagnée d'une montée d'œstradiol. À l'échographie, on voit un follicule. Les analyses de sang révèlent des pics de E2 et de P4.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Conclusions :

Pour le futur, le problème à résoudre est le problème de la vascularisation. Il faudra aussi essayer de congeler l'ovaire entier ou des follicules isolés. Pour libérer les follicules, la libérase donne de meilleurs résultats que la collagénase. En dernier, il reste les cellules souches à partir des embryons surnuméraires.

Débat :

Q : Vous dites que pour congeler le greffon il faut le maintenir pas plus de 15 min à 4°C au début. Que faut-il faire pour les cancers borderline de l'ovaire pour lesquels il est nécessaire de disséquer plus longtemps ?

R : On fait comme on peut, mais les chances sont vraiment très faibles de toutes façons. Le choix du cortex qui semble sain est empirique. De plus dans ces cancers, la réserve folliculaire est toujours très faible.

Q : Quand vous remplacez les fragments, vous collez ou vous suturez ?

R : En fait on a déposé ces fragments sans qu'il y ait eu besoin de faire un point. Quelquefois, on fait un mini point à chaque extrémité de la bandelette. Il ne faut surtout pas le recouvrir de péritoine. Nous n'avons pas de recette idéale, c'est assez empirique et puis il y a la chance aussi.

Q : Y a-t-il une incidence de la taille du fragment sur la réussite ?

R : Pour le moment, nous avons l'impression que les bandelettes donnent de meilleurs résultats que les cubes. Mais l'étude est en cours.

Q : Est-ce que vous avez fait un dosage de l'hormone anti-mullérienne ? Ce serait une preuve à apporter puisque seuls les follicules en croissance la secrètent.

R : Oui, c'est une bonne idée. Sinon, un autre conseil, c'est de toujours garder un ovaire intact et de préférence le droit, pour pouvoir ensuite l'utiliser comme lieu de greffe. Ou mieux, garder les deux et prendre des fragments de l'ovaire gauche.

Q : Chez l'enfant, qu'est-ce que vous préconisez ?

R : L'ovaire est plus résistant à la chimiothérapie chez la petite fille.

L'OVOCYTE

Congélation de l'ovocyte immature.

G Coticchio (Bologne)

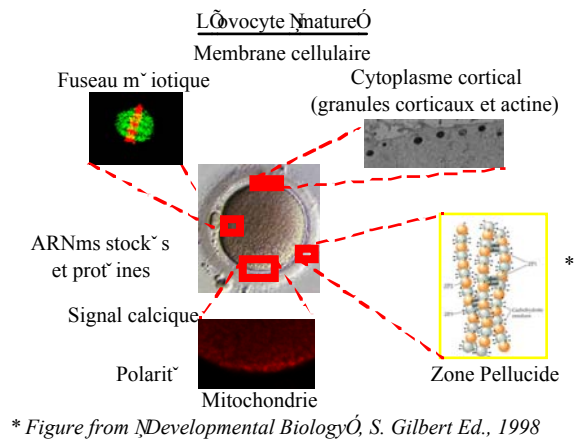
Indications de la congélation de l'ovocyte

Elle concerne les femmes dont on veut préserver la fertilité, les échecs ovariens précoces, les restrictions légales ou éthiques de la conservation des embryons, le don d'ovocytes et les échecs de production de sperme ou de récupération chirurgicale de sperme le jour de la ponction des ovocytes.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

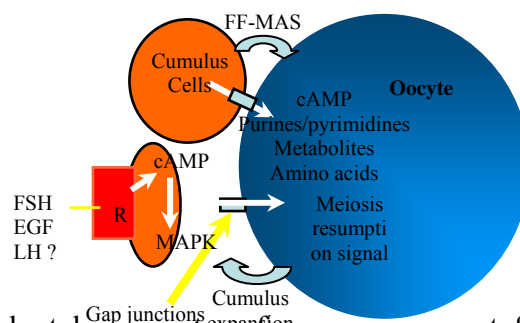
Quels ovocytes congeler ?

Ce sont les ovocytes ponctionnés dans les follicules primordiaux ou préantraux présents sur le tissu ovarien, ou encore les ovocytes en VG, prélevés dans les follicules antraux chez des patientes non stimulées, ou des patientes ou donneuses stimulées.



L'ovocyte immature

Dans l'ovocyte immature, les chromosomes sont confinés dans la vésicule germinative (VG), le fuseau est absent, et les granules corticaux ne sont pas distribués le long du cortex. À ce stade, la compétence méiotique et cytoplasmique ne sont pas encore acquises. Il est associé aux cellules du cumulus, et fonctionnellement dépendant d'elles.

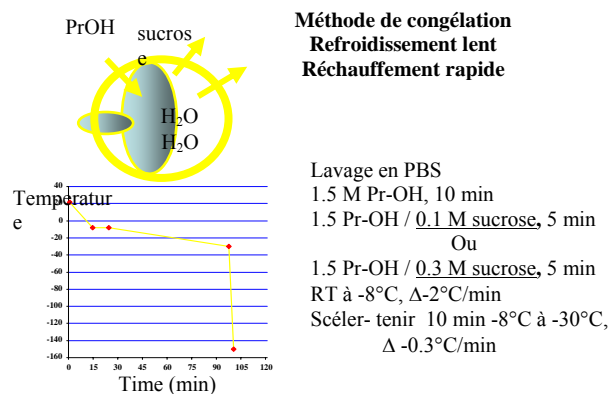


C'est une grosse cellule dont le rapport surface à volume est faible ce qui ne favorise pas les échanges de CP et d'eau entre l'environnement intra- et extracellulaire.

Les dommages créés par la congélation : La principale cause est la formation de cristaux de glace dans le cytoplasme et en particulier dans les cellules du cumulus. Pour éviter ces dommages la vitrification est une bonne solution, puisque la viscosité de la solution de congélation et la vitesse de refroidissement empêchent la formation de glace. Mais en contrepartie il y a risque de toxicité vu les fortes concentrations de CP.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Une alternative, la congélation lente contrôlée : La formation de glace est empêchée par la déshydratation induite par une exposition à des concentrations modérées de CP (1.5 M PrOH / 0.1 M sucrose), et par l'augmentation des solutés extracellulaires pendant la formation de glace à l'extérieur de la cellule. Cette technique a une excellente reproductibilité et une toxicité relativement faible. Par contre, elle présente des risques de formation de glace à l'intérieur de la cellule et de toxicité par les fortes concentrations de sels pendant la formation de la glace à l'extérieur de la cellule.



Le *réchauffement* doit se faire à très grande vitesse pour prévenir la formation de petits cristaux de glace dans la cellule, et la *réhydratation* doit se faire par exposition par étapes à des concentrations décroissantes de CP.

Résultats

Sur 82 ovocytes en VG provenant de cycles stimulés, 66 ont survécu à la décongélation, 44 ont évolué jusqu'en métaphase II. Fécondés par ICSI, 23 d'entre eux sont passés au stade 2PN et 20 ont présenté un clivage. Des taux de survie élevés sont donc possibles après le protocole conventionnel de congélation lente. Et la méiose, la fécondation et le clivage ne semblent pas affectés. Par contre, beaucoup d'ovocytes ne résistent pas à l'exposition au PrOH 1,5M.

Chez la souris, l'aptitude au développement des ovocytes en VG, congelés avec leur cumulus, est très diminuée. La membrane des cellules du cumulus est très endommagée, et leurs contacts intercellulaires réduits ; moins de 20 % des ovocytes évoluent au stade blastocyste après fécondation (Ruppert-Lingham et coll., 2003).

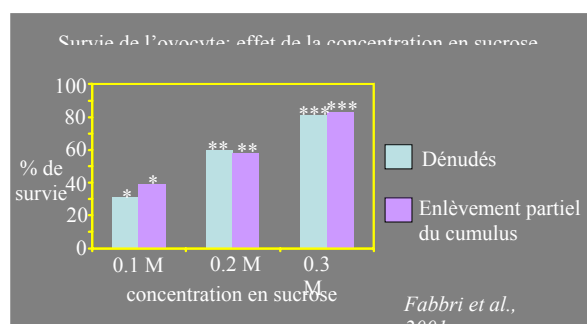
La congélation des ovocytes immatures avec leur cumulus éviterait les risques liés aux dommages du fuseau méiotique observés après congélation d'ovocytes matures, c'est-à-dire une augmentation des anomalies chromosomiques (Park et coll., 1995 ; Boiso et coll., 2002). Hélas, cette technique

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

n'est pas vraiment utile pour le moment puisque les taux de maturation *in vitro* chez l'humain sont encore très faibles, et l'organisation du fuseau méiotique est souvent affectée lors de cette technique.

L'ovocyte mature

Le taux de survie après décongélation est de 70 % en moyenne, il peut être amélioré par l'augmentation de la concentration en sucrose lors de la déshydratation, que les ovocytes soient conservés dénudés ou avec leurs cellules du cumulus.



Cependant, seulement 35 à 45 % des ovocytes matures survivent à la congélation avec le protocole lent, contre 70 à 80 % des ovocytes immatures.

La raison de cette différence tient peut-être au fait que le gène codant pour l'aquaporin-9, protéine associée à un canal localisé dans la membrane plasmique, est exprimé uniquement dans les ovocytes en VG. Pourtant la stabilité du fuseau ne semble pas affectée par la congélation (Stachecky et coll., 2004), puisque le pourcentage d'anomalies chromosomiques (aneuploïdies du chromosome 13) observées dans les embryons humains n'est pas différent pour les embryons frais ou congelés, il est de l'ordre de 25 % (Cobo et coll., 2001). Mais la congélation de l'ovocyte en MII induit une diminution de sa capacité à répondre aux ionophores calciques par une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et de la polarité des mitochondries (Jones et coll., 2004). Ces deux fonctions cellulaires sont indispensables à la fécondation et au développement embryonnaire.

Résultats

Depuis 1986, on dénombre 82 grossesses dans le monde. Au « Tecnobios Procreazione », le taux d'implantation par ovocyte congelé est de 2,2 %, alors qu'il est de 3,9 pour les embryons congelés. L'addition de sucrose à 0.3 M n'apporte pas d'amélioration de ce taux, par contre elle augmente les

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

taux de survie et de formation de 2PN par rapport à 0.1 M. Cependant le pourcentage d'embryons de type A est supérieur avec 0.1 M.

La réponse osmotique générée par l'exposition à 1.5 M de CP à 25°C se traduit par une contraction non sphérique importante de la cellule, et le volume initial n'est pas récupéré après 10 min. Une exposition séquentielle à 0.75 puis 1.5 mol/L de PrOH à 25°C réduit la contraction cellulaire, qui est alors sphérique, et réduit les variations de réponse osmotique (Paynter et coll., 2005).

Conclusions:

Malgré un taux de survie élevé après décongélation, la congélation d'ovocytes en VG n'est pas une option à retenir pour le moment compte tenu de la faible viabilité des cellules du cumulus et de la faible efficacité des protocoles de maturation *in vitro*. Par contre, la congélation d'ovocytes en MII a déjà permis une centaine de grossesses. On peut améliorer le taux de survie par congélation lente, mais l'efficacité clinique est encore inconnue, et très probablement pas optimale, et en améliorant leur réponse aux conditions osmotiques.

Maturation ovocytaire in vitro.

G Calderon (Barcelone)

La technique

La maturation *in vitro* (MIV) consiste à maintenir dans un milieu supplémenté avec du sérum et des gonadotrophines des ovocytes immatures ponctionnés dans des ovaires, stimulés ou non. Le processus de maturation se traduit par l'expansion des cellules du cumulus, le passage de l'ovocyte au stade de métaphase II avec expulsion du 1^{er} globule polaire et des changements morphologiques et fonctionnels.

POUR LA MIV	CONTRE LA MIV
Plus confortable pour la patiente	Processus de maturation moléculaire inconnu
Moins chère que la FIV	Moins efficace que la FIV
Évite les syndromes d'hyperstimulation	Utilisée uniquement chez les PCOS

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Évite les effets indésirables des GO et GnRH Évite les possibles effets à long terme des syndromes d'hyperstimulation Plus d'ovocytes disponibles pour la clinique et la recherche Plus d'ovocytes pour les programmes de don d'ovocyte	Nécessite l'ICSI Plus d'embryons nécessaires pour le remplacement Efficace seulement si plus de 10 ovocytes récupérés Taux d'avortements plus élevés qu'après FIV Problème d'empreinte génomique
--	--

Historique

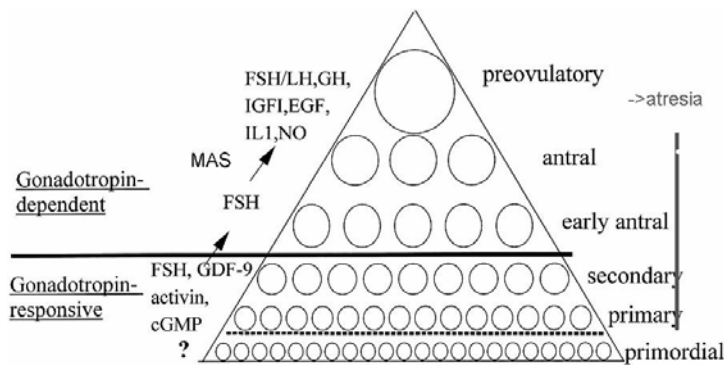
1991 : 1^{er} bébé né d'une FIV après MIV (Cha et coll.).

2001 : 1^{er} bébé né d'une MIV-FIV après congélation (Liu et coll., 2001).

Aujourd'hui, plus de 300 bébés sont nés dont 200 au Canada, 65 en Corée, 35 en Scandinavie et 22 au Japon.

Dans l'ovaire, l'ovocyte évolue au cours de la folliculogénèse et acquiert sa compétence méiotique.

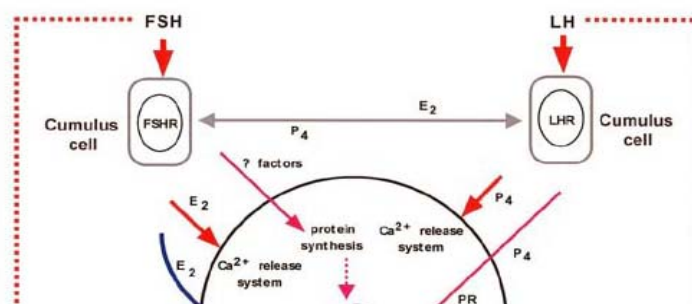
La MIV ne concerne que les ovocytes compétents en fin de folliculogénèse.



- Ovulation induite par le pic de LH et maturation méiotique
- Début antrum à antrum : dépendants des gonadotrophines
- Primaire à secondaire sensibles aux gonadotrophines.

In vitro, les ovocytes immatures compétents, entourés ou non des cellules de leur cumulus, reprennent spontanément la méiose sans apport de gonadotrophines exogènes. Cependant, les ovocytes dénudés ont un faible développement embryonnaire sans apport de FSH/LH (Cha, 1998) et de meilleurs résultats sont obtenus lorsque les complexes ovocyte-cumulus sont cultivés en présence de gonadotrophines (Anderjesz, 2000) ou d'hCG (Hreinsson et coll., 2003). Le rôle des gonadotrophines *in vitro* pourrait être d'induire la production par les cellules du cumulus de facteurs participant à la maturation nucléaire (comme le MPF) et à la maturation cytoplasmique de l'ovocyte (comme c-mos, ER, GDF-9, BMP-15, TGF- β , Ca ...).

Les organisateurs d'organismes nous n'auri et Serono. Grâce à l'indus rendus et les mettre



rmaceutique itoires Cook comptes

Indications cliniques

Les ovaires polykystiques et le syndrome des ovaires polykystiques

Les taux d'implantation sont de 10 % en moyenne, si on considère uniquement les pays où il y a le plus de résultats publiés (Canada, Japon, Corée, Danemark). Les facteurs importants à prendre en considération dans les protocoles de MIV sont les suivants :

Le priming : Le protocole standard de 10000 UI d'hCG 36 h avant l'aspiration folliculaire double les taux de grossesses cliniques comparé à une absence de priming (Chian, 2000). Par contre l'administration de FSH n'apporte aucun bénéfice (Lin et coll., 2003). Le fait de remplacer hCG par FSH semble donner des résultats contradictoires (Mikkelsen, 2003 ; Mikkelsen 2001 ; Suikkari et coll., 2000).

Les milieux de culture :

	Corée/Japon	Canada/Danemark	Taiwan
Milieu	TCM-199	Medicult-IVM	Pas de sérum rFSH 75 mUI/mL rLH 75 mUI /mL EGF, HAS, E2 Glucose 5.5 mM Ac ascorbique 0.5 mM Tampon phosphate
Suppléments	hFF (SSS) 20% (v/v) rFSH 75 mUI/mL hCG 0.5 UI/mL E2 1 µg/mL	Sérum marternel 20% rFSH 75 mUI/mL rLH 75 mUI/mL	

Dans le futur, les milieux devraient contenir du pyruvate, du glucose, de la glutamine, une source protéique (albumine recombinante), des systèmes anti-oxydants, du MAS (« meiosis activating sterol »), des facteurs de croissance, des cytokines, des gonadotrophines, de la GH, de l'activine et de l'inhibine.

Technique d'aspiration : aiguilles de 17G à une pression de 300 mmHg.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Technique de fécondation : Une étude prospective randomisée (Chian et coll., 2004), incluant des femmes de moins de 40 ans, avec des ovaires polykystiques, sous OR de J10 à J14 du cycle, avec plus de 10 follicules de 4 à 14 mm, et avec sperme normal, sous priming de hCG montre des résultats analogues entre FIV et ICSI en taux de fécondation (82,5 % et 87,5 %, respectivement).

Autres indications

Dans le cadre de la FIV classique : Le pourcentage d'ovocytes immatures retrouvés varie entre 4,4 et 21,7 % (Avrech, 1997 ; Goud, 1998). Ces ovocytes maintenus dans le milieu de FIV ont un taux de maturation et de développement embryonnaire très faible. Il faut les cultiver dans les milieux spécifiques de MIV.

Annulations pour hyperstimulation ovarienne : Le premier bébé est né en 1998 (Jarudi), 30 bébés sont nés depuis en Corée (Lim et coll., 2002).

En combinaison avec un cycle spontané, la MIV est plus confortable pour les patientes, et a moins d'effets secondaires. Elle est applicable à de nombreux couples infertiles. Le risque est de ne pas avoir embryon (CPR 0-30 %). Le taux d'implantation et le nombre de bébés nés sont similaires à ceux de la FIV après 4 cycles de traitement (Lukassen, 2003).

La MIV sera aussi indispensable après culture de follicules primaires, lors de biopsies de tissu ovarien soit frais soit congelé, ou enfin, pour les ovocytes obtenus de cellules souches (Johnson et coll., 2004 ; Hubner et coll., 2003).

Les problèmes majeurs associés à la MIV

Ce sont le taux d'avortements élevé (40 % au Canada, 57 % au Danemark, 37 % en Corée, 22 % au Japon), une incidence d'aneuploïdies, le risque de modification de l'empreinte génomique et le manque de recul actuel.

Débat :

R : Les embryons issus d'ovocytes maturés in vitro pour des patientes atteintes de PCOS sont morphologiquement semblables aux embryons issus de FIV d'ovocytes maturés in vivo, mais 90 % d'entre eux ont des anomalies chromosomiques. Le taux d'implantation est aussi significativement plus faible, peut-être est-ce aussi parce que l'endomètre est à J5 quand les embryons sont à J2 (timing de la maturation in vitro). Mais nous n'avons pas d'expérience dans la congélation de ces embryons.

Q : Est-ce nécessaire d'ajouter de la LH dans le milieu, puisqu'il n'y a de récepteurs à LH ni sur les cellules du cumulus ni sur l'ovocyte?

R : Sans doute on ne devrait pas en mettre. Mais nous devons essayer avec des gonadotrophines recombinantes en particulier FSH.

Q : Compte tenu des risques épigénétiques mis en évidence chez l'animal à cause des sérums ajoutés au milieu de culture, ne pensez-vous pas que c'est risqué de mettre du sérum maternel ?

R : Nous avons fait des études (FISH) sur des embryons cultivés en présence ou non de sérum et nous n'avons pas vu de différence. De plus, nous avons de meilleurs résultats en utilisant le sérum maternel.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

LE SPERMATOZOÏDE ET L'EMBRYON

Vitrification du spermatozoïde.

E Isachenko (*Bonn*)

Historique

1787	Spallanzani évoque la possibilité de congeler les spermatozoïdes
1787 - 2004	>5000 publications sur congélation de spermatozoïdes de différentes espèces, y compris l'homme.
1937	Luyet envisage la possibilité de vitrifier le spermatozoïde
1938 - 1959	8 publications sur vitrification avec CP de spermatozoïdes de nombreuses espèces, y compris l'homme
2002 - 2005	plusieurs tentatives de FIV humaine avec sperme vitrifié sans CP ont permis l'obtention de blastocystes.
2003 - 2004	grossesses après vitrification de spermatozoïdes humains avec CP (Schuster et coll., Desai et coll.)

Technique de vitrification

Après congélation classique, les cristaux de glace réfractent les rayons X dans trois directions alors qu'après la vitrification, ils les réfractent dans une seule direction. La vitrification peut se réaliser avec ou sans CP. Sans CP, on évite la toxicité et les chocs osmotiques; il n'y a plus besoin d'enlever ces substances au moment de la décongélation et il n'est plus nécessaire d'avoir l'équipement de congélation qui est très cher. Elle permet aussi la protection des membranes plasmiques et mitochondriales contre la peroxydation des lipides et la formation des ROS. La technique est utilisable aussi bien pour du sperme normal que pour des échantillons de sperme OAT. Enfin, on peut utiliser de très petits volumes (20 µl) pour la vitrification.

Intégrité de l'ADN après congélation

La comparaison des effets de la vitrification et de la congélation lente programmable sur l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, évaluée par le test des comètes (Donnelly et coll., 2001), montre que l'ADN est très stable et que son intégrité est indépendante du type de traitement :

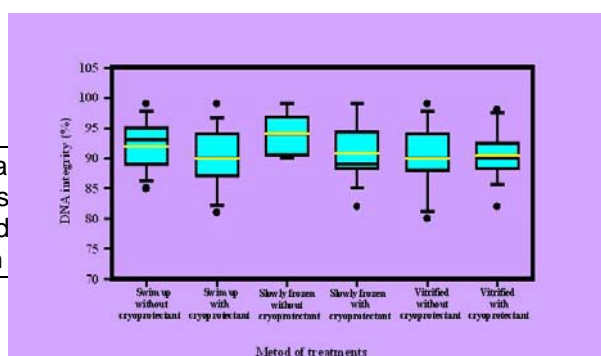


Figure 6 DNA integrity of spermatozoa according to different treatments and cryopreservation methods. Each bar represents the median, 25 and 75 percentile, minimum and maximum values.

Les organisateurs de la sans qui nous n'aurions et Serono. Grâce à l'aide rendus et les mettre en

e l'industrie pharmaceutique culier les Laboratoires Cook ou compiler ces comptes

Exposition aux vapeurs d'azote

La technique consiste à congeler des spermatozoïdes en les exposant à des vapeurs d'azote liquide (-160°C) à une vitesse de 150-250°C/min avant immersion dans l'azote liquide et à les réchauffer à 30 000°C/min. Leur motilité et l'intégrité de leur ADN sont identiques à celles de spermatozoïdes vitrifiés; par contre, comparée à celle de spermatozoïdes frais, la motilité est diminuée.

Leur capacité fécondante est aussi identique; sur 23 essais de FIV avec du sperme vitrifié avec vitesse de refroidissement rapide et 22 avec du sperme vitrifié avec vitesse de refroidissement lente, les taux de formation de 2PN étaient de 79 % et 86 % respectivement, de formation de 4-6 blastomères de 63 et 64 %, de blastocystes de 47 et 41 %.

Les supports

Pour la vitrification du sperme humain sans CP, avec vitesse de refroidissement lente, les meilleurs résultats de motilité sont obtenus avec les OPS et les open straw.

Conclusion

La méthodologie de vitrification de spermatozoïdes rapide ou lente et sans CP a de réelles perspectives de réussite en médecine de la reproduction. La vitesse de réchauffement joue aussi un rôle décisif. La technique de vitrification « straws in straws » est recommandée car elle permet une réduction des risques potentiels de contamination microbienne.

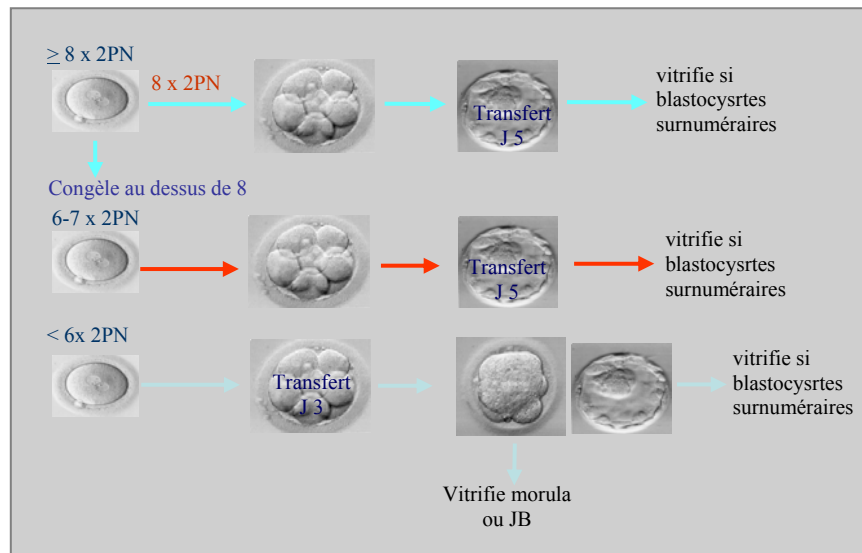
Application clinique de la vitrification des blastocyste

P Vanderzwalmen (Bruxelles)

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Peut-on utiliser la vitrification d'embryons de manière routinière dans un programme d'AMP, et pour quels stades ?

Politique de cryopréservation en Belgique



Vitrification de morula : EG - DMSO (10% - 10%) (2') puis EG - DMSO (20% - 20%) Ficoll – sucrose (30'') et enfin le support, une Hemi-Straw

Nb.cycles de vitrification-réchauffements	32
Nb. Transfers	30 (89%)
Nb. morula vitrifiés-réchauffés	78
Survie après réchauffement	68 (87%)
Blastocyste après 24 h.	56 (72%)
Nb. Moyen de blastocystes transférés	1.8
Grossesses/ cycles de vitrification	8 (25%)
F. C.	0
Grossesses évolutives	8 (simple 8, gémellaire 0)
% par cycles de vitrification	25 %
Implantation (transf blast)	8/ 56 14.2%
Implantation (blast vitrifié)	8 /78 10.3%
Naissances	2

Congélation du blastocyste

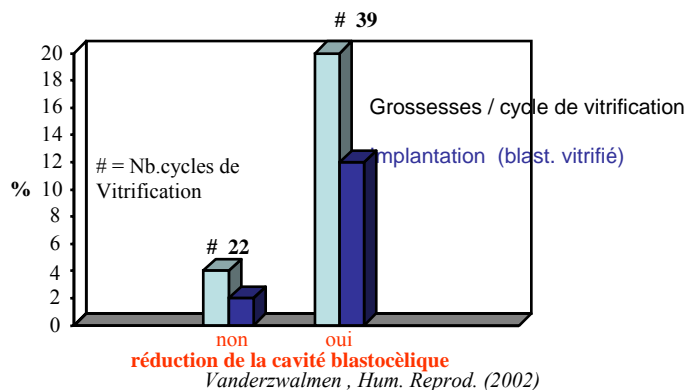
Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Technique de congélation		% grossesses évolutives
glycerol (9%) - sucrose (0.2M) - 2°C/min seeding -7°C 0.3°C/min -38°C	380 cycles (co-culture) 64 cycles (milieu séquentiel) 700 cycles (milieu séquentiel)	27 % (Menezo 1995-1999) 36% (Behr 2002) 40% (Veeck 2003)
glycerol (9%) - sucrose (0.2M) seeding -6°C 0.5°C/min -32°C	départ à -6°C départ à 20°C	31 % (blasto éclos) 5 % (blasto éclos) (Gardner 2003)
glycerol (9%) sucrose (0.2M) - 2°C/min seeding -6°C 0.3°C/min -40°C Equilibration à 37°C	295 cycles	81 % survie 30 % grossesses (Virant-Klun 2003)

Les taux de survie et d'implantation par blastocyste vitrifié sont nettement meilleurs avec les « jeunes blastocystes » qu'avec les blastocystes expansés. La facilité ou non d'accès du CP à l'intérieur de la cellule explique ces différences; le blastocèle pourrait être une source de formation de cristaux.

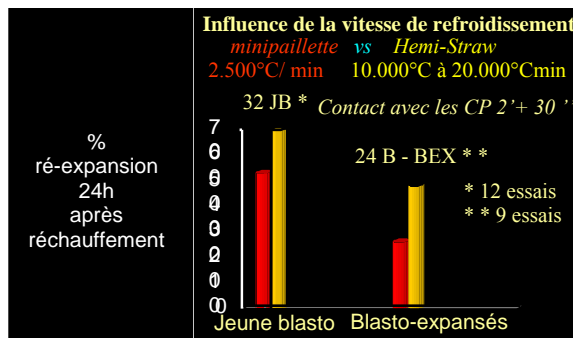
Réduction de la cavité blastocèlique : Sur 95 blastocystes avec cavité réduite, le taux de survie était de 61 %, contre 21 % pour les 87 blastocystes expansés témoins.

Pourcentage de grossesses et taux d'implantation
après vitrification de JEB et BEX avec ou sans réduction de la cavité blastocèlique
Support: « mini-paille 250 µl »



Augmentation de la vitesse de refroidissement

Survie des blastocystes après vitrification rapide ou ultra-rapide



Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Pour 14 blastocystes expansés réduits, le taux de ré-expansion après 24h était de 71 %, contre 54 % pour 13 blastocystes expansés non-réduits (différence non significative).

Augmentation de la durée d'exposition aux CP

Afin d'augmenter la pénétration des CP dans l'embryon, on peut augmenter les temps d'exposition en fonction de la taille de la cavité blastocœlique. Sur 15 blastocystes expansés exposés 2 min et 20 exposés 4 min aux CP pendant la 1^{ère} étape, à 37°C plutôt qu'à température ambiante, les taux de ré-expansion à 24h étaient de 47 et 64 %, respectivement, mais les risques de toxicité très augmentés.

Grossesses après vitrification ultra-rapide (résultats internationaux):

	Support	Nb cycles vitrif	Survie	Grossesses	Implantation
<i>Choi (2000)</i>	Grille ME	20 (37°C)	45%	5 (25%)	21%
<i>Yokota (2000)</i>	paillette	19 (vapeur)	81%	7 (37%)	18%
<i>Reed (2002)</i>	Cryoloop	5 (37°C)	100%	2 (40%)	20%
<i>Cho (2002)</i>	Grille ME	41(6 steps)	70%	14 (34%)	15%
<i>Son (2003)</i>	Grille ME	25	90%	12 (48%)	29%
<i>Mukaida (2004)</i>	Cryoloop	551	86%	177 (32%)	29%
<i>Vanderzwalmen (2003)</i>	Hemi-Straw	252	72%	56 (26%)	17%
	Total	913		273 (30%)	

Ouverture préalable la ZP. Elle permet une meilleure contraction du blastocyste et un meilleur enrobage des cellules trophoblastiques par les macromolécules. Cette technique permet un dégonflement uniforme. Lorsque la ZP est intacte, on observe un dégonflement asymétrique. Une étude rétrospective portant sur de jeunes blastocystes vitrifiés soit ZP intacte, soit ZP ouverte mécaniquement et des blastocystes expansés vitrifiés soit ZP intacte, soit ZP ouverte mécaniquement montre que les taux de ré-expansion à 24 h sont élevés et inchangés pour les premiers, et significativement améliorés pour les seconds. Ces observations ont un impact sur les programmes d'AMP, en particulier pour la congélation des embryons ayant subi une biopsie lors d'un DPI.

La qualité de l'embryon de départ a bien sûr un fort impact sur sa survie : Les taux d'implantation sont respectivement de 23 % (12/52) pour des embryons de grade A congelés à J3 et de 5 % (1/20) pour des embryons de grade B congelés à J3 (différence significative).

Si on compare le taux de grossesses après transfert de blastocystes frais, qui est d'environ 35% - 45% , au taux de grossesses après transfert de blastocystes vitrifiés, qui est d'environ 25% - 35%,

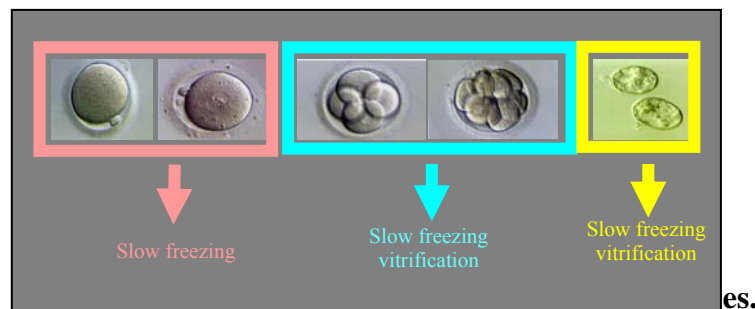
Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

on voit que l'efficacité est d'environ 75%.

Conclusions :

La vitrification laisse entrevoir des nouvelles possibilités pour congeler les ovocytes et embryons humains. Il est souhaitable de suivre les enfants issus de telles techniques, de confirmer si le taux de fausses couches est en relation directe avec un contact prolongé avec le CP, ou est dépendant de la qualité embryonnaire avant vitrification.

Il serait souhaitable aussi de proposer un protocole "universel" pour au moins chaque stade du développement.



JM Antoine (Paris)

Le but initial de la congélation de l'embryon était la prévention des grossesses multiples. En effet, parmi les accouchements FIV en 1998 au niveau mondial, 27,3 % concernaient des jumeaux, 3,4 % des triplets ou plus. Sur 100 nouveaux-nés, 49 provenaient de grossesses multiples (1 quadruple, 7 triples, 41 doubles).

Facteurs de risques des grossesses multiples
Indication masculine de FIV Rang tentative faible Taux de fécondation élevé Femme jeune Embryons de bonne qualité Nombre d'embryons transférés.

Un arrêté du 12 Janvier 1999 relatif aux règles des bonnes pratiques cliniques et biologiques en AMP stipule que le nombre d'embryons à transférer doit être discuté conjointement entre le couple, le clinicien et le biologiste. Ce nombre dépend de l'aspect des embryons et de l'âge de la patiente et de ses antécédents. Il doit être, autant que possible, limité à deux. Au-delà, les raisons doivent être

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

justifiées dans le dossier de la patiente. La congélation des embryons surnuméraires se fait si le couple a donné son accord par écrit.

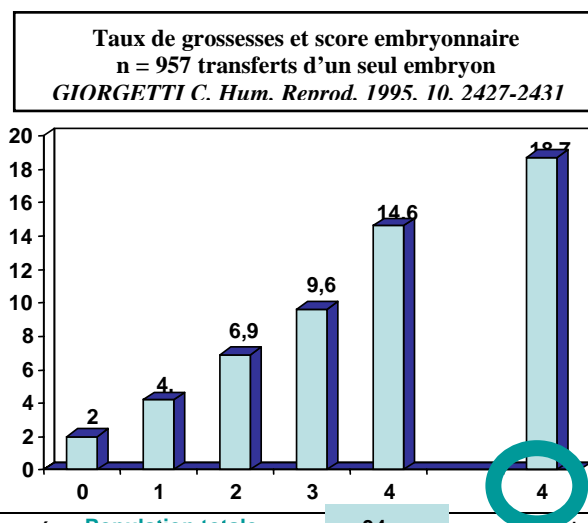
Si on considère les résultats de la diminution volontaire de 3 à 2 embryons transférés, on constate peu de modifications du taux de grossesses et de naissances d'enfants vivants, mais une quasi élimination des grossesses triples et une persistance de 20 à 25 % de grossesses gémellaires. (Dean et coll.,2000; Etude FIVNAT 2002).

La grossesse gémellaire est souvent désirée par les couples qui ne souhaitent pas revenir pour une nouvelle tentative. Elle expose à plus de complications obstétricales et périnatales par rapport aux singletons, bien qu'il n'ait pas été montré d'augmentation de ce sur-risque pour les gémellaires FIV par rapport aux gémellaires non-FIV. Il faut aussi considérer le problème économique: les grossesses doubles sont associées à des coûts globaux augmentés par rapport à ceux des grossesses uniques. Cependant, le coût d'une grossesse double n'a jamais été sérieusement comparé à celui de deux grossesses uniques successives.

Si le but est l'enfant unique, il y a deux solutions:

1 - La FIV en cycle spontané ou semi-naturel. Mais le taux de grossesses évolutives par cycle est limité. Avec 20 études réalisées portant sur 1800 cycles, 819 transferts (45,5 %) on observe 129 grossesses évolutives (7,2 % /cycle) ;

2 - La FIV en cycle stimulé avec limitation volontaire à un embryon frais transféré et congélation des autres. Si on analyse le taux de grossesses en fonction du score embryonnaire, on constate que ce taux est d'autant plus élevé que le nombre d'embryons obtenus par patiente est élevé.



Les organisateurs de la journée remercient vivement la population totale < 34 ans partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Sur 110 femmes de moins de 34 ans, après une première tentative de FIV avec ICSI, 53 ayant obtenu au moins deux embryons de qualité idéale ont eu, au hasard, un ou deux embryons transférés : sur les 26 transferts d'un seul embryon, il y a eu 10 grossesses évolutives (38,5 %) dont une double monozygote (10 %); sur les 27 transferts de deux embryons, il y a eu 20 grossesses évolutives (74 %) dont 6 doubles (30 %).

Recommandations de l'ESHRE (Workshop de Capri, 2000): Diminuer l'incidence des grossesses gémellaires en FIV/ICSI de 25-30 % à 12-15 % en transférant un seul embryon mais uniquement dans 3 conditions: femme de moins de 34 ans, 1^{er} cycle de transfert, et au moins un embryon d'excellente qualité. Ces conditions sont en fait réunies dans moins de 10% des transferts, mais ce sont les plus à risque de grossesse multiple.

Résultats Européens, pays par pays.

Finlande Avec 1871 cycles avec transfert d'un seul embryon de 1997 à 2001, la proportion de transferts uniques est passée de 11 à 56 %, le taux de grossesses multiples a baissé de 25 à 5 %, 40 % des transferts concernaient des embryons congelés et le taux cumulatif d'accouchement par ponction était de 53 %.

Suède Un décret du 1/1/2003 impose le transfert d'un seul embryon ou exceptionnellement de deux si les embryons sont de mauvaise qualité, si la femme a plus de 39 ans ou si il y a eu échec des trois transferts précédents. Le pourcentage de transfert unique est passé de 25,1 à 72,7 %. Le taux de grossesses évolutives par transfert n'a pas été modifié (30 %), par contre le taux de grossesses gémellaires est passé de 22,6 à 6,2 %.

Belgique Le coût par enfant étant moins élevé lorsqu'un seul embryon est transféré, comparé au transfert de deux embryons (De Sutter et coll., 2002), depuis le 1/07/03, six cycles de FIV/ICSI sont remboursés à condition de respecter les directives suivantes :

Femmes < 36 ans	Femmes de 36 à 39 ans	Femmes de 40 à 42 ans
1 ^{ère} tentative : 1 seul embryon (quelle que soit la qualité) ; 2 ^{ème} tentative : 1 seul embryon si au moins un top embryon, sinon 2 embryons ; 3 ^{ème} à 6 ^{ème} tentatives : max. 2	1 ^{ère} et 2 ^{ème} tentatives : maximum deux embryons 3 ^{ème} à 6 ^{ème} tentatives : maximum trois embryons	pas de limitation

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Le but est de réduire de 60 % les coûts périnataux liés aux grossesses multiples.

France : Le remplacement de deux embryons reste proposé aux femmes qui acceptent l'éventualité d'une grossesse double et dont l'utérus et les conditions socio-économiques sont favorables. Le remplacement d'un seul embryon est proposé aux femmes demandeuses d'une grossesse unique et aux couples ayant déjà plusieurs enfants ou présentant une contre-indication à la grossesse multiple (cardiopathie, utérus ma formé ou multi-cicatriciel) en les prévenant du risque de grossesse gémellaire monozygote.

Les résultats du FIVNAT 2003 montrent que lorsqu'un embryon était transféré, et les embryons surnuméraires congelés, il y a eu 13 % de grossesses en FIV et 18 % en ICSI, alors que lorsque deux embryons ont été remplacés et les embryons surnuméraires congelés, il y a eu 30,4 % de grossesses en FIV et 32,6 % en ICSI. Peut-on alors généraliser le transfert d'un seul embryon ? La réponse va dépendre de l'efficacité de la congélation.

Conclusions:

La prévention des grossesses multiples suppose un taux cumulatif acceptable de grossesses uniques, et repose sur un potentiel implantatoire élevé d'embryons frais et congelés. La part relative de la congélation est d'autant plus importante que le nombre d'embryons frais remplacés est faible.

La stratégie dépend du but fixé. Si la grossesse gémellaire doit être évitée pour raison médicale, on remplace un embryon frais, puis les congelés un par un (au détriment du taux de grossesse) = *politique sécuritaire de type suédois*. Si elle doit être évitée pour des raisons surtout économiques, on remplace un ou deux embryons frais en fonction de l'âge et du rang de tentative = *politique budgétaire de type belge*. Si elle est considérée comme une option à la rigueur acceptable, on remplace un ou deux embryons en fonction de la demande du couple, des conditions socio-économiques, utérines = *politique pragmatique de type français*.

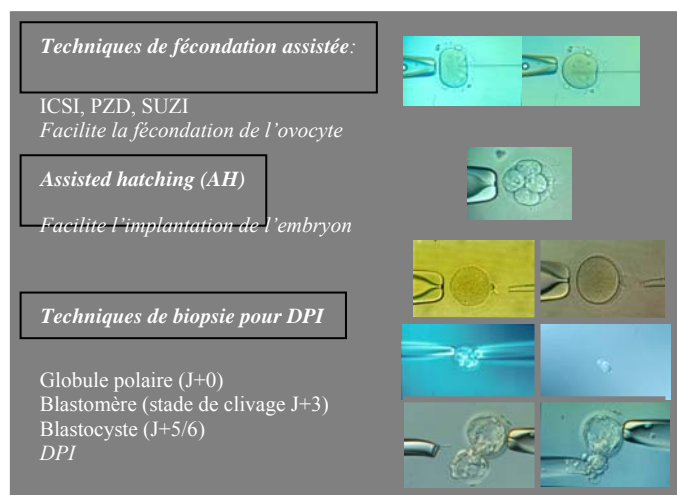
Congélation de l'embryon micromanipulé.

I Belil (Barcelone)

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Les embryons micro-manipulés sont des embryons auxquels on a fait des trous dans la ZP, matrice extracellulaire couvrant les ovocytes et les embryons des mammifères. La ZP est composée de glycoprotéines (ZP1, ZP2, ZP3). C'est une barrière spécifique de l'espèce qui fait bloc à la polyspermie et maintient l'intégrité spatiale. C'est une protection contre les virus, les toxines. Elle permet aussi le transport de l'embryon.

Les techniques de micromanipulation Pour manipuler la ZP, il y a des techniques mécaniques (micro-pipettes), chimiques (tyrode acide...), ou thermiques (Laser).



La micromanipulation de l'embryon affecte-t-elle sa capacité à être congelé ?

Le taux de développement des embryons qui survivent à la congélation est inférieur à celui des embryons frais car un certain nombre de dommages cellulaires causés par des forces mécaniques, chimiques ou thermiques au cours du procédé peut conduire à des dysfonctionnements cellulaires, voire même à la mort cellulaire.

Les études réalisées sur des embryons de souris démontrent cependant que la réalisation de petits ou larges trous dans la ZP lors de l'enlèvement d'un blastomère ne compromet pas la survie de l'embryon après congélation (Depypere et coll., 2001; Wilton et coll., 1989).

L'introduction, en FIV humaine de techniques de fécondation assistée (SUZI, ICSI) impliquant la réalisation de petits trous dans la ZP n'a pas entraîné une diminution des taux de cryosurvie ni d'implantation des embryons comparés à ceux transférés en FIV traditionnelle (Devroey et Van Steirteghem, 2004; Al-Hasani et coll., 1996). À l'Institut Dexeus en 2003 par exemple, les taux

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

d'implantation pour les embryons congelés sont de 18,9 % en FIV (n = 260) et de 20,1 % en ICSI (n = 294).

Les biopsies réalisées le plus souvent sur des embryons de 3 jours pour les DPI chez les couples présentant un risque de maladie génétique sont aussi une manipulation des embryons. Un large trou est alors pratiqué dans la ZP et 1 ou 2 blastomères sont retirés ce qui induit un stress mécanique sur les blastomères restants. Des études montrent que cette technique n'a pas de retentissement sur le développement des embryons non congelés (Hardy et coll., 1990 ; Gianaroli et coll., 1997). Le nombre d'embryons congelés après DPI est de toute façon très bas compte tenu du faible nombre d'embryons chromosomiquement normaux disponibles. Les techniques nouvelles, comme la **CGH**, qui demandent plus de temps pour l'obtention du diagnostic, impliquent nécessairement la congélation de tous les embryons ayant subi une biopsie avant leur éventuel remplacement lors de cycles ultérieurs (Wilton et coll., 2001).

Les rares données disponibles à ce jour sur le devenir de tels embryons indiquent que la moindre manipulation diminue le taux de survie des embryons après congélation/décongélation :

- L'index de survie d'embryons congelés après une biopsie était de 38 % pour 55 embryons étudiés alors que celui d'embryons congelés sans avoir subi de biopsie était de 61 % pour 94 embryons étudiés (Magli et coll., 1999).
- Les taux de survie étaient de 56,3 % pour des embryons non manipulés (n = 20), de 39,0 % pour des embryons de 3 jours ayant subi un « **drilling** » (n = 16) et de 29,5 % pour des embryons de 3 jours ayant subi une biopsie (n = 27) (Joris et coll., 1999).
- Le taux de survie d'embryons ayant subi une ZP-drilling accompagnée de l'enlèvement d'un blastomère était de 52,2 % (n = 15), celui d'embryons ayant subi une 3D-PZD accompagnée de l'enlèvement d'un blastomère de 55,2 % (n = 15), et celui d'embryons ayant subi une 3D-PZD sans enlèvement d'un blastomère de 70,6 % (n = 15) (Ciotti et coll., 2000).

L'enlèvement d'un blastomère semble donc avoir plus de retentissement négatif sur la survie de l'embryon que la manipulation de la ZP. Cependant, la modification des protocoles de congélation peut améliorer la survie des embryons manipulés. Ainsi l'augmentation de la concentration de sucrose dans le milieu de congélation et dans le milieu de décongélation ou encore la modification des macromolécules ont permis d'augmenter l'index de survie des embryons qui est passé de 46 % (n = 46) à 67 % (n = 185), l'index de survie des embryons non manipulés étant de 76 (n = 19) dans cette étude (Jericho et coll., 2003).

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

	Technique standard	Technique modifiée
Milieu de congélation	1,5M PROH, 0,1M Sucrose + 10 mg/ml HSA	1,5M PROH, 0,2M Sucrose + 20% sérum maternel
Milieu de décongélation	0,75M PROH, 0,2M Sucrose + 4 mg/ml HSA	0,75M PROH, 0,3M Sucrose + 20 mg/ml HSA

Sur 41 cycles de décongélation et 36 replacements, cette équipe a obtenu, avec ce protocole modifié un taux d'implantation de 12 %.

À l'Institut Dexeus pour notre programme de DPI entre 2001 et 2004, avec 19 cycles de décongélation, 34 blastocystes décongelés, 11 transferts, nous avons eu une grossesse qui s'est terminée par une fausse-couche.

Avec la technique d'éclosion assistée réalisée à J3 à l'aide d'une diode laser, un taux de grossesses par transfert de 31,4 % pour 35 cycles de décongélation a été obtenu, avec 118 blastocystes congelés, un taux de survie de 75,4 % et 31 transferts (Kung et coll., 2003).

Conclusions:

La manipulation de la ZP pendant l'ICSI n'a pas d'impact sur le devenir des embryons humains après congélation. La méthodologie standard de congélation semble inadéquate pour les embryons ayant subi une éclosion assistée ou une biopsie mais la modification du protocole améliore très significativement les résultats. La vitrification d'embryons manipulés de bovin donnant des résultats encourageants, les essais sur les embryons humains devraient être poursuivis.

L'ENFANT

La congélation dans un programme de don d'ovocytes.

J Tesarik (*Grenade*)

La congélation de sperme

Sperme éjaculé	Autoconservation avant thérapie stérilisante Problèmes de déplacement du patient
----------------	---

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

	Autoconservation après traitement de fragmentation d'ADN
Sperme épидидymaire ou déférent	Azoospermie obstructive
Sperme testiculaire	Azoospermie non-obstructive Azoospermie obstructive Echec du traitement de fragmentation de l'ADN

L'ICSI avec sperme éjaculé congelé (sauf indication de fragmentation de l'ADN) donne un taux de naissance similaire à celui obtenu après ICSI avec sperme frais, c'est-à-dire respectivement 32,8 et 35,1 %, ces résultats cumulent les données de 2001 à 2004. Lorsqu'il y avait indication de fragmentation de l'ADN, sur 10 tentatives, nous avons obtenu 26 embryons, 4 grossesses cliniques et 5 sacs.

Avec sperme épидидymaire, les tentatives d'ICSI entre 2001 et 2004 ont donné 35,3 % de naissances lorsque le sperme était congelé, et 33,3 % lorsqu'il était frais.

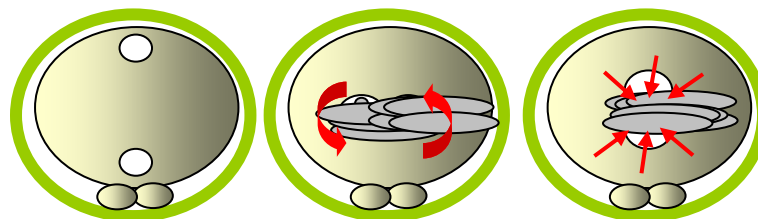
Lorsque le sperme testiculaire était prélevé pour azoospermie non-obstructive, les tentatives d'ICSI, entre 2001 et 2004, ont donné 20,0 % de naissances lorsque le sperme était congelé, et 26,8 % lorsqu'il était frais. Lorsque le sperme testiculaire était congelé pour indication de fragmentation de l'ADN, sur les 12 tentatives d'ICSI nous avons eu 32 embryons, 8 grossesses cliniques et 8 sacs.

La congélation des embryons

On congèle soit des embryons sélectionnés parmi les embryons surnuméraires, soit tous les embryons disponibles. Entre 2001 et 2004, on a obtenu 10,0 % de naissances dans le premier cas avec 531 embryons et 161 tentatives, et 15,7 % dans le deuxième avec 102 embryons et 32 tentatives.

L'âge de l'embryon

Jour 1 (2PN) : il faut alors évaluer les pronoyaux dont l'évolution au cours du temps a été décrite (Van Blerkom et coll., 1995 ; Edwards et coll., 1997 ; Gianaroli et coll., 2003), et certaines formes anormales sont reconnaissables.



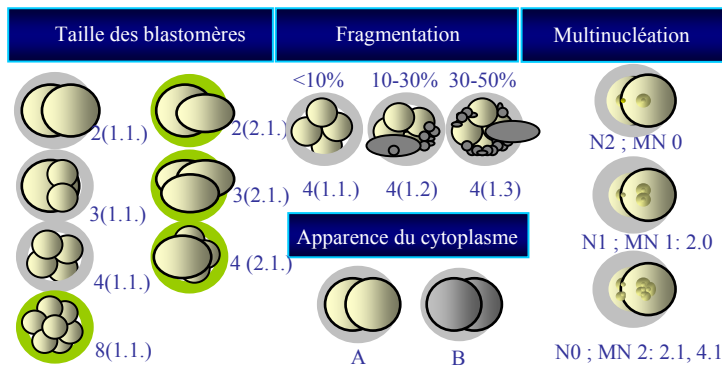
Jour 2 : 2-4 cellules

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Jour 3 : 6-8 cellules

Jour 5-6 : blastocyste

Évaluation de la qualité embryonnaire et de sa viabilité : Elle doit tenir compte de la vitesse de clivage, de la symétrie des blastomères, du degré de fragmentation, de la multinucléation.



L'évaluation du blastocyste est basée sur la taille du blastocœle, la taille et la forme de la masse cellulaire interne et l'aspect du trophoctoderme. En fonction de ces paramètres, on considère trois types de blastocyste : le blastocyste précoce, le blastocyste complet et le blastocyste en expansion. Le timing de la formation du blastocyste est aussi extrêmement important. À J5, un blastocyste est considéré d'excellente qualité si le blastocœle emplit entièrement l'embryon, la masse cellulaire interne a de nombreuses cellules, très compactes et les cellules du trophoctoderme sont cohésives et nombreuses. Un blastocyste est considéré de bonne qualité si le blastocœle n'emplit pas entièrement l'embryon, la masse cellulaire interne a des cellules groupées mais peu compactes et les cellules du trophoctoderme forment un épithélium relâché. Enfin, un blastocyste est considéré valable si le blastocœle n'emplit pas entièrement l'embryon, la masse cellulaire interne est peu développée et les cellules du trophoctoderme sont peu développées.

Entre 2001 et 2004, le taux de naissances après remplacement d'embryons congelés et évalués ne varie pas de façon significative en fonction du stade auquel les embryons ont été congelés. Il était de 20,0 % pour les embryons congelés à J1 (n = 150), de 14,3 % pour les embryons congelés à J2 (n = 84), de 8,8 % pour les embryons congelés à J3 (n = 294) et de 17,5 % pour les embryons congelés au stade blastocyste (n = 40).

La combinaison de l'évaluation des pronoyaux, et du stade de clivage semble donner d'aussi bon résultat que l'évaluation du blastocyste. (Rienzi et coll. 2002). La culture jusqu'au stade blastocyste n'est donc pas un pré-requis nécessaire à la politique du transfert d'un seul embryon (Van Royen et coll., 1999; Gerris et coll., 2000).

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

La congélation d'ovocytes

Méthode du futur, elle devrait permettre une auto-conservation avant des thérapies stérilisantes, ou encore une meilleure économie pour les dons d'ovocytes. Actuellement, les taux de réussite sont toujours très insuffisants. Il faut donc analyser les échecs, et trouver des voies d'amélioration.

Devenir de l'embryon congelé.

F Thepot (Paris)

Les données du Ministère

Pour l'année 2000, les bilans des couples ayant des embryons congelés sont rapportés ci-après :

Année 2000						
	Nombre	Projet parental				Total
Couples	total	En cours	Inconnu	Interrompu	Non rapporté	inconnu
Délai de conservation						
5 ans ou moins	18972	13541	2118	2207	1106	3224
Plus de 5 ans	5640	1103	1743	2665	129	1872
Non rapporté	0	0	0	0	0	0
Total	24612	14644	3861	4872	1235	5096

Année 2000						
	Nombre	Projet parental				Total
Embryons	total	En cours	Inconnu	Interrompu	Non rapporté	inconnu
Délai de conservation						
5 ans ou moins	69039	49768	8087	8292	2892	10979
Plus de 5 ans	23248	4709	7087	10838	614	7701
Non rapporté	0	0	0	0	0	0
Total	92287	54477	15174	19130	3506	18680
Arrêt conservation	1038					

Il y a donc en moyenne 3,7 embryons par couple.

Le nombre total d'embryons congelés est passé de 61067 en 1997 à 92287 en 2000. Le nombre de ceux pour lesquels le projet parental est en cours est de 54477 en 2000, et ceux pour lesquels le projet parental est interrompu est de 19130. Pour les autres, il s'agit d'embryons pour lesquels le projet parental est inconnu ou non rapporté. Il y a en fait 15 à 18 % d'embryons en plus chaque

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

année (il y en a 153000 en 2003), avec en moyenne de 2 à 4 embryons par couple. On constate aussi une augmentation de la « demande d'arrêt de conservation » au détriment des inconnus.

Une enquête de la fédération des CECOS à partir de 12 centres volontaires sur les données de 2000, portant sur 23009 embryons correspondant en fait à environ 25 % des embryons congelés en France, montre la distribution suivante: 46,8 % sont en attente, 16,5 % sont sans information, pour 7,7 % une demande de fin de conservation a été faite, pour 0,2 % il y a eu décès de l'un ou l'autre des parents, pour 2,3 %, les parents se sont séparés, 8,1 % sont entrés dans des programmes de don et enfin 4,8 % ont été donnés aux laboratoires pour étude.

Une expérience du CMCO du CHU de Strasbourg donne des informations similaires : 50 % des embryons congelés sont en poursuite de projet parental, 20 % prévus pour un don, 2 à 3 % donnés à la recherche, et 30 % font l'objet d'une demande d'arrêt de conservation. Toujours au CMCO, une évaluation faite au 31 décembre 2004 sur 705 couples interrogés (2211 embryons) montre que 140 étaient favorables à l'idée de donner leurs embryons en vue d'un don (502 embryons) mais seulement 61 (240 embryons) sont venus en consultation. En Belgique, dans l'équipe de Van Steirteghem, une estimation du devenir des embryons congelés montre aussi que 50 % sont en poursuite de projet parental, 20 % sont donnés pour la recherche, 10 % sont donnés pour des couples d'accueil, 10 % sont en demande d'arrêt de conservation et 10 %, les couples ne peuvent se prononcer.

Les conditions nécessaires pour l'accueil d'embryons congelés sont d'ordre légal et réglementaire (tribunal, accord écrit, délai...), d'ordre sanitaire (sécurité virale...), d'emploi (appariement, risques, résultats...). De ce fait, des projets de don ne se réaliseront pas.

Utilisation des embryons pour la recherche

En France, les recherches sur l'embryon ou les cellules embryonnaires sont interdites, mais il y a des dérogations qui sont soit temporaires (moratoire de 5 ans pour évaluer les recherches sur les embryons et les cellules souches embryonnaires), soit définitives (embryons issus d'un DPI ; si ces études ne portent pas atteinte à l'embryon).

En cas de recherche, il s'agit uniquement d'embryons *in vitro* sans projet parental, et avec accord explicite des couples : il est interdit de fabriquer des embryons à des fins de recherche, et toute forme de clonage est interdite.

Dans ce cadre, l'Agence de Biomédecine (ABM) jouera un rôle dans le bilan des embryons disponibles, l'autorisation des protocoles, le suivi des recherches, la vérification des conditions de mise en œuvre et fera un bilan au terme des 5 ans.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Les conditions requises pour mettre fin à la conservation des embryons impliquent une interrogation annuelle des couples. La fin de conservation se fait sur demande confirmée du couple s'il n'y a plus de projet parental des deux, si les conditions pour une AMP ne sont pas remplies, si un don n'est pas souhaité ou impossible, s'il n'y a pas de consentement pour donner les embryons pour la recherche, et au bout de 5 ans, la fin de la conservation aura lieu quoiqu'il arrive.

Suivi des enfants nés de la congélation : propositions.

F Olivennes (Paris)

Études disponibles

Données périnatales : Concernant les études sur les enfants issus d'embryons congelés, on a surtout des données périnatales sur 50 enfants (Frydman et coll., 1989), 30 enfants (Heijnsbroek et coll., 1995), 232 enfants (Wada et coll., 1994) ou 8438 cycles (FIVNAT, 1994). Dans ces études, les groupes contrôles sont les transferts d'embryons frais, et les paramètres étudiés (âge maternel, poids à la naissance, mortalité périnatale) ne sont pas différents. Les malformations majeures sont même moins fréquentes. Dans l'étude de Wennerholm et coll. (1997), où 270 enfants ont été suivis, le groupe témoin regroupe les FIV classiques et les grossesses spontanées et aucune différence significative n'est observée.

Suivis à moyen terme.

Sutcliffe et coll., 1995 : 92 enfants ont été suivis, et le groupe témoin était constitué par les enfants nés de grossesses spontanées. Les tests d'intelligence se sont avérés supérieurs pour les enfants nés après FIV, mais ils étaient issus de classes sociales plus favorisées ; les complications périnatales étaient aussi plus élevées.

Olivennes et coll., 1996 : 89 enfants ont été suivis, et comparés à des enfants nés de grossesses spontanées ; en dehors d'un taux de complications supérieur, aucune autre différence n'a été observée .

Wennerholm et coll., 1998 : 255 enfants ont été suivis, et comparés à des enfants nés de FIV après transferts d'embryons frais ou de grossesses spontanées et aucun problème majeur n'a été observé; mais la méthodologie utilisée dans cette étude était incapable de détecter des atteintes mineures.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

Points faibles.de ces études

- Puissance insuffisante
- Absence de groupe contrôle
- Groupe contrôle inapproprié
- Tests mal standardisés
- Recueil par opérateurs multiples
- Appariements inappropriés
- Perdus de vue
- Evaluation insuffisante ou « grossière »

Par exemple, si on prend une malformation congénitale avec une incidence de 2 %, la détection d'un doublement avec un degré de risque à 5% et 80% de chance de détection nécessiterait deux groupes de 1000 enfants, et pour une atteinte de 1/1000 il faudrait des groupes de 20000 enfants !

Quels sont les risques pour l'enfant ?

Les anomalies congénitales peuvent être chromosomiques, ou pas. Les problèmes encourus dans le futur pourraient être des risques d'infertilité, de cancer ou encore inconnus.

Les questions que l'on doit se poser avant de mener ce genre d'étude sont:

- 1) Que veut-on analyser ? La santé, l'intelligence, l'adaptation sociale, la relation parents/enfants ? Mais qu'est-ce qu'un enfant normal ? Et comment tenir compte de l'importance de l'éducation ?
- 2) Quelle méthodologie utiliser ? Prospective ou rétrospective ? Quels tests utiliser ? À quels âges ? Combien d'enfants faut-il suivre et pendant combien de temps ? Et que fait-on des perdus de vue ?
- 3) Quels groupes contrôles retenir ? Les enfants conçus spontanément (mais les parents ne sont pas comparables) ? Les enfants issus de transfert frais sont à *priori* le meilleur groupe contrôle. Mais comment apparier et sur quels critères ? Et qui va accepter ce suivi et pour combien de temps ?
- 4) Est-ce éthique de faire ces suivis ? Quelle serait l'influence de l'étude elle-même sur le développement de l'enfant et sur les relations familiales ? Comment gérer le secret que certaines familles tiennent à garder ? Comment faire avec le groupe contrôle, souvent moins motivé ?
- 5) Comment financer ? Ceci est la grande question.

Les critères de qualité de ces études

- Le caractère prospectif
- Les grands nombres

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

- L'exhaustivité des enfants conçus
- L'existence d'un groupe contrôle
- Les appariements et ajustements
- La méthodologie et les tests

Quelles sont les possibilités : une grande étude multicentrique, l'agence de bio médecine, le « follow-up » ??

Conclusions.

JM Antoine (Paris)

Même si la congélation ne donne pas les résultats les meilleurs aujourd'hui, elle existe et ne peut qu'augmenter sa part dans l'AMP, ne serait-ce qu'avec cette évolution du remplacement d'un seul embryon qui va nous amener à congeler de plus en plus d'embryons, sauf à évoluer vers les cycles spontanés ce qui ne semble pas être tout à fait d'actualité.

Le deuxième point sur lequel je voudrais revenir par rapport à cette journée c'est que, en congélation comme en FIV fraîche, on est vraiment à la traîne en France par rapport à pas mal d'équipes proches. C'est vraiment une réalité tangible qui pose question, et qui n'est pas propre à la congélation. De quoi cela vient-il ? Il y a là un réel problème.

Les nouvelles techniques dont on parlait depuis un certain temps, la vitrification, la congélation d'ovaire... sont vraiment maintenant une réalité. Le succès avec ces deux grossesses annoncées aujourd'hui vient le souligner. Elles vont donc entrer dans nos méthodes thérapeutiques de plus en plus, et là aussi la France ne doit pas rester à la traîne.

Dernière conclusion enfin, et ce à titre un peu plus personnel, la SMR existe et c'est quelque chose, pour les gens qui ont participé à sa fondation de vraiment satisfaisant. Des réunions comme celle d'aujourd'hui sont là pour témoigner de sa vitalité. J'espère que nous pourrions en organiser encore beaucoup d'autres.

Références

Al-Hasani S, Ludwig M et coll. 1996 Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization Human Reprod **11**, 604-607

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

- Anderiesz C, Fong CY, Bongso A, Trounson AO. Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6-dimethylaminopurine. *Hum Reprod.* 2000 Feb;15(2):379-88.
- Avrech OM, Goldman GA, Rufas O, Stein A, Amit S, Yoles I, Pinkas H, Fisch B. Treatment variables in relation to oocyte maturation: lessons from a clinical micromanipulation-assisted in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet.* 1997 Jul;14(6):337-42.
- Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod.* 2002 Jul;17(7):1885-91.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril.* 1991 Jan;55(1):109-13.
- Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update.* 1998 Mar-Apr;4(2):103-20..
- Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2000 Jan;15(1):165-70.
- Ciotti PM, Lagalla C et coll. 2000 Micromanipulation of cryopreserved embryos and cryopreservation of micromanipulated embryos in PGD. *Mol Cell Endocrinol* **169**, 63-67
- Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril.* 2001 Feb;75(2):354-60
- Dean NL, Phillips SJ, Buckett WM, Biljan MM, Tan SL. Impact of reducing the number of embryos transferred from three to two in women under the age of 35 who produced three or more high-quality embryos. *Fertil Steril.* 2000 Oct;74(4):820-3.
- Depypere HT, Carrol JC et al. 1991 Normal survival and in-vitro development after cryopreservation of zona-drilled embryos in mice *Human Reproduction* **6**, 432-435
- Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update.* 2004 Jan-Feb;10(1):19-28.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril.* 2001 Nov;76(5):892-900.
- Edwards LJ, Batt PA, Gandolfi F, Gardner DK. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol Reprod Dev.* 1997 Feb;46(2):146-54.
- FIVNAT 2002
FIVNAT, 1994
- Frydman R, Forman RG, Belaisch-Allart J, Hazout A, Fernandez H, Testart J. An obstetric analysis of fifty consecutive pregnancies after transfer of cryopreserved human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Jan;160(1):209-13.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability. *Fertil Steril.* 2003 Feb;79(2):407-10.
- Gerris J, Van Royen E. Avoiding multiple pregnancies in ART: a plea for single embryo transfer. *Hum Reprod.* 2000 Sep;15(9):1884-8..
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril.* 1997 Dec;68(6):1128-31.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril.* 2003 Aug;80(2):341-9.
- Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1638-44.
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod.* 1990 Aug;5(6):708-14.
- Heijnsbroek I, Helmerhorst FM, van den Berg-Helder AF, van der Zwan KJ, Naaktgeboren N, Keirse MJ.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

- Follow-up of 30 pregnancies after embryo cryopreservation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995 Apr;59(2):201-4.
- Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, Levkov L, Ek I, Suikkari AM, Hovatta O, Fridstrom M. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: a randomized study. *Hum Reprod.* 2003 Oct;18(10):2131-6.
- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd, Boiani M, Scholer HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science.* 2003 May 23;300(5623):1251-6.
- Jarudi 1998
- Jericho H, Wilton L et coll. 2003. A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Human Reprod* **18**, 568-571
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature.* 2004 Aug 26;430(7003):1062.
- Jones A, Van Blerkom J, Davis P, Toledo AA. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Hum Reprod.* 2004 Aug;19(8):1861-6.
- Joris H, Van den Abbeel E et coll. 1999 Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Human Reprod* **14**, 2833-2837
- Kung F, Lin Y et coll. 2003 Transfer of frozen-thawed blastocysts that underwent quarter laser-assisted hatching at the day 3 cleaving stage before freezing. *Fertil Steril* **79**, 893-899
- Lim et coll., 2002
- Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, Hsieh BC, Huang SC, Chen CY, Chen PH. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003 Aug;18(8):1632-6.
- Liu et coll 2001
- Lukassen, 2003
- Magli MC, Gianaroli L et coll. 1999 Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Human Reprod* **14**, 770-773
- Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction.* 2001 Oct;122(4):587-92.
- Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, Lindenberg S. Time interval between FSH priming and aspiration of immature human oocytes for in-vitro maturation: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online.* 2003 Jun;6(4):416-20.
- Olivennes F, Kadhel P, Rufat P, Fanchin R, Fernandez H, Frydman R. Perinatal outcome of twin pregnancies obtained after in vitro fertilization: comparison with twin pregnancies obtained spontaneously or after ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 1996 Jul;66(1):105-9.
- Park et coll., 1995 ;
- Paynter SJ, Borini A, Bianchi V, De Santis L, Flamigni C, Coticchio G. Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. *Hum Reprod.* 2005 Jan 21; [Epub ahead of print]
- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi MG, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod.* 2002 Jul;17(7):1852-5.
- Ruppert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ, Shaw RW. Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing. *Hum Reprod.* 2003 Feb;18(2):392-8.
- Stachecki JJ, Munne S, Cohen J. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2004 Jun;8(6):664-72.
- Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O, Barnes F. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod.* 2000 Apr;15(4):747-51.
- Sutcliffe AG, Taylor B, Grudzinskas G, Thornton S, Lieberman B. Children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 1998 Aug 15;352(9127):578-9.

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.

- De Sutter P, Gerris J, Dhont M. A health-economic decision-analytic model comparing double with single embryo transfer in IVF/ICSI. *Hum Reprod.* 2002 Nov;17(11):2891-6.
- Tesarik J, Hazout A, Mendoza C. Enhancement of embryo developmental potential by a single administration of GnRH agonist at the time of implantation. *Hum Reprod.* 2004 May;19(5):1176-80.
- Tucker et coll., 2001
- Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update.* 1995 Sep;1(5):429-61.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999 Sep;14(9):2345-9.
- Van Steirteghem AC, Van der Elst J et al. 1994 Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection *Fertil Steril* **62**, 775-780
- Vatja G, Holm P et al. 1997 Survival and development of bovine blastocyst produced in vitro after AH, vitrification and in-straw direct rehydration. *J Reprod Fert* **111**, 65-70
- Wada I, Macnamee MC, Wick K, Bradfield JM, Brinsden PR. Birth characteristics and perinatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod.* 1994 Mar;9(3):543-6.
- Wennerholm UB, Albertsson-Wikland K, Bergh C, Hamberger L, Niklasson A, Nilsson L, Thiringer K, Wennergren M, Wikland M, Borres MP. Postnatal growth and health in children born after cryopreservation as embryos. *Lancet.* 1998 Apr 11;351(9109):1085-90.
- Wennerholm UB, Hamberger L, Nilsson L, Wennergren M, Wikland M, Bergh C. Obstetric and perinatal outcome of children conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod.* 1997 Aug;12(8):1819-25.
- Wilton LJ, Shaw JM et al. 1989 Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* **51**, 513-517

Les organisateurs de la journée remercient vivement tous les partenaires de l'industrie pharmaceutique sans qui nous n'aurions pas pu réaliser cette belle manifestation et en particulier les Laboratoires Cook et Serono. Grâce à l'aide précieuse des Laboratoires Ferring, nous avons pu compiler ces comptes rendus et les mettre en ligne à votre intention sur notre site. Encore merci.