



PUBLICATION DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE N° 8630

Conservation par vitrification de cellules et tissus reproducteurs

2 mars 2011

1. INTRODUCTION

Le 10 décembre 2009, le Conseil Supérieur de la Santé (CSS) a reçu, de l'Agence Fédérale des Médicaments et Produits de Santé (AFMPS), une demande d'avis concernant la conservation par vitrification des cellules et tissus reproducteurs.

Dans le cadre des inspections et de l'octroi d'agrément aux banques de matériel corporel humain liées aux programmes de procréation médicalement assistée, l'AFMPS souhaite objectiver l'approche de ce procédé.

L'AFMPS demande donc au CSS de définir les critères pour ce type de conservation et d'intégrer l'avis dans les standards de qualité pour les cellules et tissus reproducteurs.

Le 9 août 2010, le CSS a reçu, de l'AFMPS, une question complémentaire concernant l'utilisation de systèmes « ouverts » pour la vitrification d'ovocytes et d'embryons humains : « L'utilisation d'azote liquide non stérile est-elle compatible avec la méthode de vitrification ou faut-il appliquer d'autres aspects qualitatifs au niveau de l'azote liquide? ».

Ces questions ont tout d'abord été soumises à un sous-groupe d'experts avant que le sujet ne soit traité par le groupe de travail « Cellules, tissus et organes d'origine humaine et animale ». Les expertises suivantes étaient représentées au sein du sous-groupe : matériel corporel humain, médecine de la reproduction, embryologie et cryobiologie.

2. RECOMMANDATIONS

Le CSS formule les réponses suivantes aux questions de l'AFMPS et propose les recommandations provisoires ci-après.

Cet avis reprend la situation actuelle de la technique relative à la vitrification des cellules reproductrices.

1. Vitrification des embryons et des blastocystes :

Dans ce cas, la vitrification est une technique validée et reproductible. Il n'existe pas de différence en matière d'efficacité entre la vitrification en systèmes fermés et en systèmes ouverts. Dans un souci de sécurité (contamination et contamination croisée), le CSS recommande cependant d'utiliser des systèmes fermés tant pour l'étape du refroidissement que pour le stockage. Différents systèmes fermés sont disponibles dans le commerce.

2. Vitrification des ovocytes en métaphase II :

2.1. La vitrification des ovocytes est plus efficace que la congélation contrôlée lente. Si les ovocytes doivent être conservés, le CSS recommande d'utiliser les techniques

de vitrification. Ces techniques de vitrification pour ovocytes humains doivent toutefois encore être optimisées.

- 2.2. Les données de la littérature actuellement disponibles indiquent que les systèmes fermés semblent donner des résultats satisfaisants mais leur efficacité par rapport aux systèmes ouverts doit encore être objectivée. Sur base théorique, l'utilisation de systèmes fermés doit avoir la préférence mais, vu le manque actuel d'informations suffisantes concernant leur efficacité, le CSS est d'avis que les systèmes ouverts peuvent encore temporairement être utilisés.
3. Vitrification des spermatozoïdes et des tissus gonadiques :
Ces techniques ne sont pas encore au point et la congélation lente reste la méthode de cryoconservation recommandée.
4. En cas d'utilisation aussi bien de systèmes ouverts que fermés lors de la vitrification et du stockage, les systèmes ouverts doivent être physiquement séparés des systèmes fermés durant le stockage.
5. Pour les systèmes ouverts et fermés qui ont été dans le passé tous deux utilisés et stockés, une conservation mixte est tolérée pour une période transitoire de 5 ans. Dans le cas où après ces 5 ans de stockage, la prolongation de la conservation des échantillons en système ouvert ou leur donation pour la recherche scientifique est souhaitée, ces échantillons doivent être alors physiquement séparés des échantillons en système fermé.
6. Si les données sérologiques ne sont pas connues ou sont indisponibles, les systèmes de vitrification doivent être conservés dans des banques de quarantaine ou dans des systèmes garantissant l'absence de contaminations croisées (*High security straws*) bien identifiés.
7. Dans le cadre des procédures de vitrification fermée, semi-fermée et ouverte, la vitrification et le stockage dans l'azote liquide non stérile sont autorisés.
8. L'avis sera revu dans deux ans et, sur base des éventuelles nouvelles données de la littérature, il sera adapté.

3. ELABORATION ET ARGUMENTATION

Liste des abréviations utilisées

AFMPS	Agence Fédérale des Médicaments et Produits de Santé
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CSS	Conseil Supérieur de la Santé
CPA	<i>Cryo-Protectant Agent</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EG	Ethylène glycol
ESHRE	<i>European Society for Human Reproduction and Embryology</i>
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
HSV	<i>High security vitrification</i>
ICSI	Injection intracytoplasmique de sperme
PG	Propylène glycol
RCT	<i>Randomized controlled trial</i>
UE	Union Européenne.

3.1 Méthodologie

L'avis est basé sur une revue exhaustive de la littérature scientifique récente et de la littérature grise ainsi que sur l'opinion des experts.

3.2 Elaboration

3.2.1 *Que disent les standards de qualité spécifiques pour les cellules et tissus reproducteurs actuellement? (CSS 8292)*

Le paragraphe E.2.2.4 de l'avis CSS 8292 (Standards de qualité pour les tissus et cellules reproducteurs) mentionne ce qui suit au sujet de la cryoconservation dans l'azote liquide ou gazeux : « la conservation et le stockage par cryoconservation sont possibles aussi bien dans l'azote liquide que dans l'azote gazeux pour autant qu'un protocole validé existe au sein de la banque. En ce qui concerne les dons ayant une potentialité de contamination, des mesures de sécurité doivent être établies au sein de la banque afin d'éviter toute contamination (par exemple par utilisation de *high security straws* ou d'un stockage séparé) ». Il est vrai que tous les dons entre partenaires impliquent une contamination potentielle (étant donné qu'ils ne sont pas placés en quarantaine mais congelés immédiatement), de sorte que des conteneurs distincts ou des *high security straws* doivent de toute façon être utilisés. Les méthodes employées pour congeler (congélation contrôlée lente ou vitrification) ne sont mentionnées nulle part.

3.2.2 *Contexte*

Toutes les cryoconservations en médecine de la reproduction ont un objectif : arrêter l'horloge biologique. Parmi les avantages de la cryoconservation des ovocytes dans un contexte de fécondation *in vitro* (FIV), on pense tout d'abord à de meilleures possibilités de résultats avec les ovocytes de donneur. Premièrement, une cryoconservation optimale permet de dégager une certaine marge pour la conservation d'ovocytes de donneur sous forme de banques d'ovocytes et pour le screening ultérieur éventuel du donneur en ce qui concerne les risques pour la santé tels qu'une contamination par l'hépatite B. Ensuite, l'utilisation d'ovocytes de donneur cryoconservés signifie également que les cycles du donneur et du receveur ne doivent plus être synchronisés. De plus, la cryoconservation des ovocytes peut également se dérouler en cas d'absence de spermatozoïdes durant le traitement FIV/ICSI ou préalablement à un traitement potentiellement nocif des ovaires (p. ex. chimio- ou radiothérapie). La cryoconservation peut également contribuer largement à la diminution du nombre d'embryons surnuméraires dans la pratique FIV actuelle. Enfin, pour les personnes qui ont des objections de principe contre la formation d'embryons surnuméraires, la possibilité de cryoconserver les ovocytes représente une diminution de la charge morale/éthique. Pour toutes ces raisons, il est essentiel de disposer de techniques de cryoconservation très efficaces pour les ovocytes humains.

En raison de leur taille et de leur sensibilité au froid, la congélation des ovocytes humains en métaphase II au moyen des procédures classiques de congélation contrôlée lente et de décongélation reste particulièrement difficile. La littérature indique clairement que la congélation contrôlée lente des ovocytes est suboptimale et non exempte de risques (Oktay et al., 2006).

Depuis l'introduction de la FIV, la cryoconservation des embryons fait partie intégrante de tout traitement de la stérilité. Un large spectre d'embryons peut être congelé : des embryons unicellulaires au jour 1 (zygote) du cycle de collecte d'ovocytes, des embryons en division aux jours 2 et 3 du cycle et des blastocystes aux jours 5 et 6 du cycle. Elle permet d'accroître les chances de conception au départ d'une seule ponction ovocytaire grâce à la possibilité qu'elle offre d'effectuer un, voire plusieurs transferts additionnels différés. En effet, des embryons surnuméraires peuvent être décongelés ultérieurement si le transfert d'embryons frais n'a pas été couronné de succès. De plus, afin d'éviter une épidémie iatrogène de jumeaux et de triplés, le transfert d'un seul embryon est appliqué en Belgique depuis 2003 (Royaume de Belgique, 2003) dans des conditions bien déterminées. Il faudrait tenter de parvenir à ce que, après le transfert d'embryons et de blastocystes décongelés, la procréation de jumeaux et triplés soit évitée. Pour ce faire, après décongélation, il serait préférable qu'un seul embryon décongelé soit mis en place. La cryoconservation constitue donc un excellent moyen pour éviter des grossesses multiples en FIV. Il est clair que de telles stratégies exigent que des programmes de cryoconservation efficaces soient disponibles.

En ce qui concerne les embryons et les blastocystes, on doit constater, après plus de 20 ans de pratique des techniques de congélation contrôlée lente, que, malgré une cryo-expertise étendue,

la chance de naissance d'un enfant en bonne santé est de 3 à 7 % par embryon congelé et décongelé et de 5 à 10 % par embryon transféré, en fonction de la procédure utilisée et de la qualité morphologique et du stade de développement de l'embryon avant congélation. A l'opposé, les chances d'implantation par transfert d'embryons frais s'élèvent en Belgique et en moyenne à 20 % (*Belgian Register for Assisted Procreation: BELRAP*). Il s'avère parfois difficile de récupérer les embryons humains entièrement intacts immédiatement après décongélation et les embryons présentant des dommages cellulaires ont en outre une chance moindre d'implantation que les embryons intacts. Manifestement, les procédures de congélation contrôlée qui s'avèrent pleines de succès pour les embryons et blastocystes d'autres mammifères, ne peuvent pas s'appliquer aussi simplement aux embryons et blastocystes humains. Récemment, une méthode de vitrification a été introduite (vitrification en volume minimum) avec des résultats très prometteurs aussi bien pour les ovocytes, que pour les embryons et les blastocystes humains (Kuwayama et al., 2005).

3.2.3 Raison d'être de la vitrification

Deux facteurs jouent un rôle important dans l'apparition de dommages dus à la cryoconservation des ovocytes et des embryons : (1) formation de glace intracellulaire et (2) dommages causés par le processus de déshydratation (dommages osmotiques). La vitrification est une méthode de congélation qui, contrairement à la congélation lente, n'implique pas la formation de cristaux de glace. C'est la solidification d'une solution à très basse température. Donc, d'un point de vue théorique, la vitrification est à l'origine de moins de dommages à l'embryon/l'ovocyte car le stress mécanique, la sensibilité au froid et les dommages osmotiques dus à une formation de glace cristalline sont contrés. On peut dès lors s'attendre à ce que la vitrification d'ovocytes et d'embryons entraîne une plus grande efficacité de la cryoconservation et que les méthodes de vitrification des cellules reproductrices supplanteront les méthodes contrôlées lentes.

Cryobiologie de la vitrification

La vitrification consiste en une transformation complète d'une solution en un état vitreux, exempt de cristaux, en la refroidissant jusqu'à -196°C par exemple. Cet état amorphe ou vitrifié intra et extra cellulaire est obtenu grâce à la combinaison de cryoprotecteurs en concentration élevée, associée à une vitesse de refroidissement extrêmement rapide. Lorsque des ovocytes et des embryons doivent être vitrifiés, on utilise généralement une solution de cryoprotecteurs pénétrants et non pénétrants. Les cryoprotecteurs pénétrants (diméthylsulfoxyde - DMSO, propylène glycol - PG, éthylène glycol - EG) protègent la cellule à l'intérieur et à l'extérieur et les cryoprotecteurs non pénétrants (sucrose, galactose) protègent la cellule par déshydratation osmotique. Pour une vitrification couronnée de succès et sûre, différents paramètres doivent être correctement ajustés, à savoir la concentration en cryoprotecteurs de même que la durée et la température d'exposition, les vitesses de refroidissement et de réchauffement et le système de support utilisé (système servant de conteneur pour l'embryon) (Pegg, 2005; Vajta & Nagy, 2006; Vajta & Kuwayama, 2006; Yavin & Arav, 2007). En 2005, Paynter a également précisé que les protocoles de cryoconservation à développer devaient être très reproductibles, principalement afin d'éviter une variabilité des résultats entre les centres et au sein même des centres. Cela revêtait surtout de l'importance lors de la vitrification d'ovocytes et d'embryons.

On parle de vitrification avec équilibre lorsque des concentrations très élevées en cryoprotecteur sont utilisées, principalement supérieures à 50 % (v/v). En cas de vitrification avec équilibre, la solidification est relativement indépendante des vitesses de refroidissement et de réchauffement et des volumes relativement importants d'échantillons peuvent être vitrifiés. Les concentrations en agent cryoprotecteur (CPA - *Cryo-Protectant Agent*) utilisées sont toutefois tellement élevées qu'elles sont toxiques pour les cellules reproductrices et cette technique de vitrification n'est donc pas opérationnelle pour les gamètes et les embryons humains.

En cas de vitrification sans équilibre, la concentration en CPA est ramenée à des concentrations non toxiques (30 % v/v). Pour obtenir la vitrification, des vitesses de refroidissement très élevées constituent alors une absolue nécessité. Plus la vitesse de refroidissement est élevée, plus la concentration en CPA nécessaire à la vitrification est basse. Le défi de la vitrification en FIV consiste à trouver cet équilibre entre les concentrations les moins toxiques en CPA garantissant

une vitrification (extracellulaire et intracellulaire) à des vitesses de refroidissement et de réchauffement possibles. Le moyen le plus simple pour obtenir des vitesses de refroidissement et de réchauffement élevées réalistes est donc d'utiliser de très petits volumes et de plonger l'échantillon directement dans de l'azote liquide. Cette technique a été appliquée pour la première fois par Vajta et al. (1997). Il a développé un système *Open Pulled Straw* dans lequel moins d'1 µl d'échantillons (30 % CPA) contenant des ovocytes ou des embryons pouvaient être chargés. Grâce au contact direct de la solution de vitrification avec l'azote liquide, il a créé des vitesses de refroidissement et de réchauffement supérieures à 20.000°C/min avec pour conséquence une vitrification apparente de la goutte. Le succès de la méthode de vitrification reposait également sur une conjonction correcte d'une pénétration suffisante des CPA pénétrants (EG, PG, DMSO ou mélanges) et une déshydratation suffisante par un CPA non pénétrant (sucrose, tréhalose, galactose). A noter que, en raison de la concentration moindre en CPA dans la solution de vitrification, tant durant le refroidissement que durant le réchauffement, la solution de vitrification doit traverser une zone à risque où la formation de cristaux de glace (intracellulaire et extracellulaire) est possible. Cette «approche de volume minimal» représente actuellement la norme en matière de méthode de vitrification en FIV.

3.3 Problématique

La vitrification (principalement utilisée pour les ovocytes et les embryons) est une technique spéciale de congélation où l'on peut travailler dans des systèmes ouverts (*open pulled straw*, *Cryoloop*, *Cryotop*, *Electron Microscope grid*) ou dans des systèmes fermés plus récents (*High security vitrification – (HSV) straws*, *Cryo-Tip™*, *Cryopette™*, *Rapid VITi™*). Contrairement aux systèmes ouverts, en travaillant dans des systèmes fermés, on satisfait entièrement aux normes de l'avis CSS 8292. Dans le cas d'utilisation des systèmes ouverts, un contact direct entre le tissu ou les cellules et l'azote est possible, ce qui permet une éventuelle contamination microbienne et/ou virale (Bielanski et al., 2000; Bielanski et al., 2003) et il s'agit d'une raison pour laquelle la directive européenne exige une séparation physique des échantillons.

La controverse concernant les systèmes de vitrification ouverts et fermés repose sur des opinions contradictoires dans la littérature. Pour certains, rien de tel que les (anciens) systèmes ouverts mais dans de nombreux pays, en raison de l'inquiétude relative à la contamination (croisée), on passe de plus en plus aux systèmes fermés. Dans le cadre des méthodes de vitrification fermées, l'étape de vitrification de même que l'étape de stockage sont fermées (méthode *straw in straw*; Kuleshova, 2009).

Outre la problématique de la contamination potentielle des systèmes ouverts, la controverse relative aux systèmes fermés et ouverts est également alimentée par les affirmations :

- que sans contact direct de l'échantillon avec l'azote liquide, la vitesse de refroidissement est influencée de sorte que la vitrification est compromise (Vajta et al., 2009);
- que la vitesse de réchauffement est prépondérante par rapport à la vitesse de refroidissement de sorte que la vitrification fermée est possible à condition que le réchauffement ouvert soit appliqué (Seki & Mazur, 2008);
- que la phase de refroidissement peut être séparée de celle de stockage (Vajta et al., 2009).

Conclusions

En cas d'utilisation aussi bien de systèmes ouverts que fermés lors de la vitrification et du stockage, les systèmes ouverts doivent être physiquement séparés des systèmes fermés durant le stockage.

Pour les systèmes ouverts et fermés qui ont été dans le passé tous deux utilisés et stockés, une conservation mixte est tolérée pour une période transitoire de 5 ans. Dans le cas où, après ces 5 ans de stockage, la prolongation de la conservation des échantillons en système ouvert ou leur donation pour la recherche scientifique est souhaitée, ces échantillons doivent être alors physiquement séparés des échantillons en système fermé.

Si les données sérologiques ne sont pas connues ou sont indisponibles, les systèmes de vitrification doivent être conservés dans des banques de quarantaine ou dans des systèmes garantissant l'absence de contaminations croisées (*High security straws*) bien identifiés.

Dans le cadre des procédures de vitrification fermée, semi-fermée et ouverte, la vitrification et le stockage dans l'azote liquide non stérile sont autorisés.

3.4 Que dit la littérature au sujet de l'efficacité de la vitrification par rapport à la congélation lente et sur l'efficacité des systèmes de vitrification ouverts et fermés pour les ovocytes, les embryons et les blastocystes humains?

3.4.1 Embryons et blastocystes

Dans une étude randomisée et contrôlée (RCT - *Randomized controlled trial*) ainsi que dans différentes méta-analyses et revues de littérature, il a été récemment démontré que la vitrification des embryons et des blastocystes est supérieure à la congélation lente (AbdelHafez et al., 2010 ; Balaban et al., 2008; Kolibianakis et al., 2009).

En 2005, Kuwayama et al. ont comparé le système Cryotop™ ouvert avec le système Cryo-Tip™ fermé pour les blastocystes et ils ont trouvé que les deux systèmes fournissaient d'aussi bons résultats. Un tableau provenant de cette publication le montre bien:

Tableau 1. Survival, pregnancy and delivery rates after single embryo transfer of human blastocysts vitrified with either the Cryotop or the CryoTip method

	Cryotop™ (ouvert)	Cryotip™ (fermé)
<i>Survived/vitrified rate (%)</i>	221/227 (97)	82/88 (93)
<i>Pregnancy/transfer rate (%)</i>	131/221 (59)	42/82 (51)
<i>Delivery/transfer rate (%)</i>	113/221 (51)	39/82 (48)

No significant differences between corresponding values were found.

Dans une revue récente, Kader et al. indiquent très clairement que d'excellents résultats peuvent être obtenus pour les blastocystes avec les systèmes tant fermés qu'ouverts (Kader et al., 2009). Vous trouverez ci-dessous un tableau comparatif provenant de cette publication :

Tableau 2: Comparison of survival, implantation and pregnancy rates according to loading device

	Loading Device	Sample Size	Survival Rate	Implantation Rate	Pregnancy Rate
Mukaida et al., 2001	Cryoloop (ouvert)	N = 60	63 %	-	31 %
Cho et al., 2002	EM grid (ouvert)	N = 21	83 %	-	34 %
Reed et al., 2002	Cryoloop (ouvert)	N = 54	100 %	15 %	-
Mukaida et al., 2003	Cryoloop (ouvert)	N = 725	80 %	20 %	37 %
Osada et al., 2003	Cryotop (ouvert)	N = 580	99 %	-	56 %
Stehlik et al., 2005	Cryotop (ouvert)	N = 41	100 %	-	50 %
Takahashi et al., 2005	Cryoloop (ouvert)	N = 1.129	86 %	29 %	44 %
Kuwayama et al., 2005	Cryotip (fermés)	N = 5.695	90 %	-	53 %
Liebermann et al., 2006	Cryotop (ouvert)	N = 547	97 %	31 %	46 %
Mukaida et al.,	Cryoloop (ouvert)	N = 5.412	92 %	36 %	49 %

L'étude de Kuwayama et al. (2005) est la seule à utiliser un système fermé dans cet aperçu mais, il s'agit d'une très vaste étude (n = 5.695).

Un résumé récent lors du congrès de l'*American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) à Atlanta en 2009 (Desai et al., 2009) a comparé un système ouvert et deux systèmes fermés en ce qui concerne les embryons et les blastocystes et est parvenu à la conclusion que tant le système ouvert (CryoloopTM) qu'un des systèmes fermés (*HSV straws*TM) étaient les meilleurs et l'un et l'autre étaient supérieurs au système fermé Cryo-TipTM.

La littérature plus récente concernant les **blastocystes et les systèmes fermés** (Stachecki et al., 2008; Van der Zwalmen et al., 2010a; Liebermann, 2009) confirme les résultats et observations de Kuwayama et al. (2005).

Liebermann, 2009

Implantation/Blastocyst replaced: 166/543 (30,6 %)

Implantation/Blastocyst warmed: 166/563 (29,6 %)

Vander Zwalmen et al., 2010a

Implantation/Blastocyst replaced: 60/231 (25,9 %)

Implantation/Blastocyst warmed: 60/348 17,2 %

Stachecki et al., 2008

Implantation/Blastocyst replaced: 37/80 (46,2 %)

Implantation/Blastocyst warmed: 37/93 (39,7 %)

Wilding et al. (2010) ont également décrit d'excellents résultats pour la vitrification des zygotes et embryons humains en utilisant des systèmes fermés.

Un résumé récent présenté au congrès de l'*European Society for Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) à Rome en 2010 (Portmann et al., 2010) compare un nouveau système fermé (CryopetteTM) avec un système fermé existant (Cryo-TIPTM) pour la vitrification des ovocytes, embryons et blastocystes humains. Pour tous ces stades, l'utilisation de CryopetteTM semble donner des résultats comparables à ceux de Cryo-TIPTM.

Dans un résumé de Balaban et al. (2008) présenté durant le congrès ESHRE à Barcelone (2008) des résultats de la vitrification d'embryons de 8 cellules humains ont été montrés en utilisant un système fermé RapidVitTM commercialisé par Vitrolife. Après réchauffement de plus de 250 embryons, 72,1 % étaient entièrement intacts. Un pourcentage d'implantation par embryon transféré de 29,7 % a été obtenu. La firme Vitrolife a présenté en 2010 des données cliniques complémentaires rassurantes (*online*) tant pour les embryons que pour les blastocystes humains en utilisant le système fermé RapidVitTM.

Il faut toutefois souligner au sujet de tous ces différents systèmes fermés que, sous l'influence de températures et pression extrêmes, tous les types de plastique utilisés dans les supports ne sont pas imperméables aux virus dangereux et autres contaminants. Une soudure peu soignée des supports peut, dans certains cas, être source de danger, surtout si les supports sont constitués de plastique de basse qualité (Vajta et al, 2009).

Conclusion

Dans le cas des embryons et blastocystes humains, la vitrification est une technique validée et robuste. Il n'existe pas de différence en matière d'efficacité entre la vitrification en systèmes fermés et en systèmes ouverts. Dans un souci de sécurité (contamination et contamination croisée), le CSS recommande cependant d'utiliser des systèmes fermés tant pour l'étape du

refroidissement que pour le stockage. Différents systèmes fermés sont disponibles dans le commerce.

3.4.2 Ovocytes

Il ressort d'une méta-analyse d'études de cohortes et d'études comparatives non randomisées que la vitrification permet une meilleure survie morphologique, plus de grossesses cliniques et de naissances vivantes par transfert (Oktay et al., 2006).

Selon Vajta et al. (2009), il est absolument nécessaire que les vitesses de refroidissement soient très élevées pour la vitrification des ovocytes humains en raison de leur taille. Etant donné que la vitesse de refroidissement est plus faible dans les systèmes fermés que dans les systèmes ouverts, aucun système fermé n'offrirait, selon lui, suffisamment de garantie pour une vitrification réussie des ovocytes. En outre, il exclut aussi complètement le refroidissement par des « surfaces solides réfrigérées », car jugées comme étant non fiables. La littérature semble lui donner raison jusqu'à présent. Différents auteurs rapportant une vitrification d'ovocytes couronnée de succès font tous usage de systèmes ouverts (Antinori et al., 2007; Cobo et al., 2010; Kuwayama et al., 2005; Nagy et al., 2009; Rienzi et al., 2010). Ils décrivent tous une survie morphologique supérieure à 90 %, un taux de fécondation de > 90 %, une formation de blastocystes et un taux de naissances vivantes comparables aux ovocytes frais. C'est un fait cependant que, dans ces publications, ce sont principalement des ovocytes de donneurs qui sont vitrifiés. Il s'agit, par définition, d'ovocytes de femmes plus jeunes et donc de qualité optimale. Une question reste ouverte, à savoir si la vitrification d'ovocytes pour des patientes non fertiles donnera les mêmes résultats.

L'affirmation de Vajta a récemment été mise en cause par celle disant que la vitesse de réchauffement est prépondérante par rapport à la vitesse de refroidissement lorsqu'il s'agit de survie après vitrification. Une vitesse de réchauffement élevée peut empêcher que des cristaux de glace microscopiquement petits et inoffensifs, apparus durant l'étape de vitrification, ne se développent en formes nocives durant la phase de réchauffement (Seki & Mazur, 2008). Deux études ont été publiées qui vitrifient les ovocytes dans des systèmes fermés et qui garantissent une vitesse de réchauffement élevée (Smith et al., 2010; Van der Zwalmen et al., 2010a). Les deux études montrent que la vitrification des ovocytes au moyen de systèmes fermés peut fonctionner, mais que l'efficacité est plus faible que celle décrite dans la littérature pour les systèmes ouverts Cryo-TOP. Récemment, le système fermé Cryo-TIP™ a également été comparé au système ouvert Cryo-TOP. Il ressort clairement de cette étude que le Cryo-TOP obtient de meilleurs résultats en termes d'efficacité (Paffoni et al., 2010). L'UZ de Bruxelles a lancé une étude prospective randomisée comparant un système ouvert à un système fermé pour la vitrification d'ovocytes de donneurs. L'étude était randomisée en ce qui concerne la survie morphologique. Aucune différence de survie morphologique n'a été démontrée entre un système fermé (92 %, 73 ovocytes) et un système ouvert (83 %, 64 ovocytes). Après vitrification fermée, 6 grossesses ont été obtenues dans cette étude après 12 procédures de transfert d'embryons. Bien que cette étude n'ait de valeur qu'au niveau de la survie morphologique, les résultats en matière de grossesse montrent que la vitrification fermée d'ovocytes humains peut fonctionner. Cette étude est encore en cours et n'est donc pas publiée à ce jour.

Kuleshova (2009) suggérait que tout support, ouvert ou fermé, peut fonctionner de manière efficace pour autant que la procédure de vitrification (type de CPA et concentration, ajout et dilution de CPA) soit optimisée pour chacun des stades du développement. Van der Zwalmen et al. (2010b) décrivent qu'il est indiqué, pour compenser la perte de vitesse de refroidissement, d'augmenter la concentration en CPA.

Une autre méthode suggérée est de séparer l'étape de refroidissement (la vitrification) du stockage (méthodes de vitrification semi-fermées) (Bielanski & Vajta, 2009 ; Kuleshova, 2009 ; Vajta et al., 2009). Le raisonnement est le suivant: le contact du liquide (et de l'ovocyte) avec l'azote liquide est absolument nécessaire pour une vitrification intra- et extracellulaire sûre. Après

l'étape de refroidissement, le support vitrifié est placé dans une paille *High Security*, soudée (fermée) et stocké dans l'azote liquide non stérile. Lors du réchauffement une des extrémités de la paille peut être coupée pour permettre un réchauffement ouvert.

L'inconvénient de cette méthode reste qu'une contamination peut se produire durant la phase de refroidissement, une contamination croisée durant le stockage est toutefois exclue vu l'utilisation de supports externes *High Security*. La phase de refroidissement peut être réalisée dans de l'azote liquide non stérile (Vajta et al., 2009).

Pourtant, certains suggèrent d'utiliser de l'azote liquide stérile pendant la phase de refroidissement (Parmegiani et al., 2010). L'azote liquide stérile peut être obtenu par filtration 0,2 µm ou par rayonnement UV (Bielanski & Vajta, 2009 ; Parmegiani et al., 2010 ; Vajta et al., 2009). L'azote stérile reste stérile dans des conditions totalement stériles. Pour cette raison, la vitrification stérile est particulièrement complexe à exécuter au quotidien. Pour l'instant, le stockage dans de l'azote liquide stérile n'est même pas sur le plan technique réaliste. Dans les systèmes ouverts, semi-fermés et fermés, les cuves métalliques destinées à contenir l'azote liquide devraient être soigneusement et systématiquement désinfectées (patient après patient). Il est également important de préciser qu'aucun cas de contamination croisée et de contamination des patients et des enfants n'a jamais été rapportée dans le milieu de FIV (Pomeroy et al., 2010; Vajta et al., 2007).

La problématique des systèmes ouverts et de la contamination (croisée) durant le stockage pourrait être résolue par un stockage dans l'azote en phase gazeuse (Cobo et al., 2010). Il semble toutefois que le stockage en phase gazeuse dans des cuves plus grandes et sophistiquées ne garantit pas la non apparition d'une contamination (Grout & Morris, 2009 ; Pomeroy et al., 2010). En outre, il faut avoir une garantie absolue quant à l'amplitude des gradients de température dans le système en phase gazeuse (Pomeroy et al., 2010). De petites variations répétées de température peuvent, à terme, entraîner des dommages définitifs à l'ovocyte. En outre, le risque de dévitrification spontanée (vu les volumes particulièrement petits) est beaucoup plus important dans la phase gazeuse que dans l'azote liquide.

En ce qui concerne les ovocytes humains, l'ASRM considère la méthode de vitrification comme étant toujours expérimentale. Pour parvenir à une procédure de vitrification reproductible conforme à la directive de l'Union Européenne (UE) et sûre, d'autres études sont indiquées.

On peut s'attendre à ce qu'en 2011, un plus grand nombre de données soient mises à disposition au sujet des ovocytes humains et des systèmes de vitrification fermés.

Conclusions

La vitrification des ovocytes est plus efficace que la congélation contrôlée lente. Si les ovocytes doivent être conservés, il est recommandé d'utiliser les techniques de vitrification. Ces techniques de vitrification pour ovocytes humains doivent toutefois encore être optimisées.

Les données de la littérature actuellement disponibles indiquent que les systèmes fermés semblent donner des résultats satisfaisants, mais leur efficacité par rapport aux systèmes ouverts doit encore être objectivée. L'utilisation de systèmes fermés doit, sur base théorique, avoir la préférence mais, vu le manque actuel d'informations suffisantes concernant leur efficacité, le CSS est d'avis que les systèmes ouverts peuvent encore temporairement être utilisés.

3.4.3 Tissu ovarien et testiculaire

L'application de la cryoconservation des tissus ovariens et testiculaires par la vitrification n'en est encore qu'aux premiers balbutiements et est considérée comme purement expérimentale. Deux études font rapport de l'utilisation de techniques de vitrification pour le tissu ovarien humain (Keros et al., 2009 ; Xiao et al., 2010). Une congélation lente contrôlée reste ici provisoirement la norme. La vitrification de tissu testiculaire et de spermatozoïdes en est, elle aussi, qu'à ses premiers pas.

Conclusion

Ces techniques ne sont pas encore au point et la congélation lente reste la méthode de cryoconservation recommandée pour le tissu ovarien et testiculaire.

4. REFERENCES

- AbdelHafez F, Desai N, Abou-setta A, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *RBM Online* 2010; 20:209-22.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *RBM Online* 2007; 14:72-9.
- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman M, Hamilton R, et al. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism, and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008;23:1976-82.
- Bielanski A, Bergeron H, Lau P, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003; 46:146-52.
- Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40:110-16.
- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 2009;24(10):2457-67.
- Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010; 25:2239-46.
- Cobo A, Romero J, Perez S, de los Santos M, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril* 2010; 94:1903-7.
- CSS - Conseil Supérieur de la Santé. Standards de qualité pour les cellules et tissus reproducteurs. Bruxelles: CSS;2009. Avis n° 8292.
- Desai N, Xu J, AbdelHafez F. Vitrification carriers and DNA damage: open versus closed systems for cryopreservation of cleavage and blastocyst stage embryos. *Fertil Steril* 2009; 92(3):349 Suppl 2009.
- Grout B., Morris J. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology* 2009;71:1079-82.
- Kader A, Choi A, Orief Y, Argawal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 16(7):99.
- Keros V, Xella S, Hultenby K, Petterson K, Sheiki M, Volpe A, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:1670-83.
- Kolibianakis E, Venetis C, Tarlatzis B. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Current Opinion in OB Gyn* 2009; 21:270-4.
- Kuleshova L. Fundamentals and current practice of vitrification. In: Borini A, Coticchio G, editors. *Preservation of human oocytes: from cryobiological science to clinical applications*: Informa Healthcare United Kingdom; 2009. p. 63-1.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11:300-8.
- Kuwayama M, Vajta G, Leda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(5):608-15.
- Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: an update. *RBM Online* 2009;19 suppl 4:4328.
- Nagy Z, Chang C, Shapiro D, Bernal D, Elsner C, Mitchel-Leef D, et al. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertil Steril* 2009;92:520-6.
- Oktay K, Cil A, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006; 86:70-80.
- Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, Liliana R, Nicolosi A, Claudia S, et al. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *RBM*

Online:doi:10.1016/j.rbmo. 2010. Available from: URL:<
[http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)00722-4/abstract](http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)00722-4/abstract)>

- Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni G, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. . Fertil Steril 2010; 94:1525-28. Internet: accessed.
- Pegg D. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. 5. Hum Fertil 2005; 8:231-9.
- Pomeroy K, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R, et al. Storage of cryopreserved tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. Fertil Steril 2010;94:1181-8.
- Portmann M, Nagy Z, Behr B. Evaluation of blastocyst survival following vitrification/warming using to different closed carrier systems. Hum Reprod Suppl, in press 2010.
- Rienzi L, Romano S, Albricci L, Magiulli R, Capalbo A, Baroni E, et al. Embryo development of fresh versus vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. Hum Reprod 2010;25(66-73).
- Royaume de Belgique. Arrêté royal du 4 juin 2003, annexe 4 – annexe 15 relatif aux modalités pour le règlement relatif à la reproduction médicalement assistée. M.B. du 16 juin 2003. p. 32127.
- Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified Mouse oocytes and the recrystallization of intracellular ice. Biol Reprod 2008; 79:727-37.
- Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of Mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. Cryobiology 2009; 59:75-82.
- Smith G, Serafini P, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vittification. Fertil Steril 2010;94:2088-95.
- Stachecki J, Garrisi J, Sabino S, Caetano J, Wiemer K, Cohen J. A new safe, simple ans successful vitrification method for bovine and human blastocysts. RBM Online 2008; 17:360-7.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. Theriogenology 2006; 65:236-44.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Vitrification of porcine embryos using the open-pulled straw (OPS) method. Acta Vet Scand 1997; 38:349-52.
- Vajta G, Kuwayama M, Van der Zwalmen P. Disadvantages and benefits of vitrification. . In: Tucker M, Liebermann J, editors. Vitrification in assisted reproduction: a user's manual and trouble shooting guide: Informa Healthcare United Kingdom; 2007. p. 33-44.
- Vajta G, Nagy Z. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. RBM Online 2006; 12:779-96.
- Van der Zwalmen P, Zech N, Lejeune B, Wirtleiner B, Zech M, Ectors F. Vitrification and the use of high concentrations of cryoprotectants: is it a justified argument to prefer slow freezing? Gyn Ob Fertil 2010; 38(9):536-40.
- Van der Zwalmen P, Zech N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Papatheodorou A, Lejeune B, et al. Closed carrier device: a reality to vitrify ovocytes and embryos in aseptic condition. Gyn OB Fertil 2010;38(9):541-6.
- Wilding M., Capobianco C., Montanaro N., Kabili G., Di Matteo L., Fusco E., Dale . Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction. J Assist Reprod Genet 27:549-554, 2010.
- Xiao Z, Wang Y, Lei L, Lou S, Shan-wei L. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. Fertil Steril 2010; 94:2323-8.
- Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. Theriogenology 2007; 67:81-9.

5. COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Tous les experts ont participé à *titre personnel* au groupe de travail. Les noms des experts du CSS sont annotés d'un astérisque *.

Les experts suivants ont participé à l'élaboration de l'avis :

DE SUTTER Petra*	gynécologue, médecine reproductive	UZ Gent
THONON Fabienne*	médecine reproductive, embryologie	CHR de la Citadelle de Liège
VANSTEENBRUGGE Anne*	embryologie	CHR Namur
VAN DEN ABBEEL Etienne*	embryologie	UZ Gent

Le sous-groupe de travail a été présidé par Petra DE SUTTER et le secrétariat scientifique a été assuré par Muriel BALTES.

Les experts suivants ont relu et approuvé l'avis :

ANGENON Elyane*	art infirmier, coordination de la transplantation	ULB
BAUDOUX Etienne*	médecine, thérapie cellulaire	ULg
BEELE Hilde*	médecine, dermatologie	UZ Gent
DELFORGE Alain*	médecine, thérapie cellulaire	ULB
DELLOYE Christian*	médecine, chirurgie orthopédique	UCL
GUNS Johan*	sciences médico-sociales	UZ Brussel
MUYLLE Ludo*	médecine, biologie clinique	AFMPS Vigilance - UZA
PIRNAY Jean-Paul*	sciences médicales	LabMCT HCB-KA
VAN GEYT Caroline*	sciences médico-sociales	UZ Gent
VAN RIET Ivan*	médecine, thérapie cellulaire	UZ Brussel
VANDERKELEN Alain*	médecine, chirurgie générale	EHB
VERBEKEN Gilbert*	biologie, QA/QC/RA	LabMCT HCB-KA

L'administration était représentée par :

BONTEZ Walter	Coordination sang, cellules, tissus et organes	AFMPS
VANTHUYNE Karen	Coordination sang, cellules, tissus et organes	AFMPS

Le groupe de travail a été présidé par Hilde BEELE et le secrétariat scientifique a été assuré par Muriel BALTES.

Au sujet du Conseil Supérieur de la Santé (CSS)

Le Conseil Supérieur de la Santé est un service fédéral relevant du SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement. Il a été fondé en 1849 et rend des avis scientifiques relatifs à la santé publique aux ministres de la santé publique et de l'environnement, à leurs administrations et à quelques agences. Ces avis sont émis sur demande ou d'initiative. Le CSS ne prend pas de décisions en matière de politique à mener, il ne les exécute pas mais il tente d'indiquer aux décideurs politiques la voie à suivre en matière de santé publique sur base des connaissances scientifiques les plus récentes.

Outre son secrétariat interne composé d'environ 25 collaborateurs, le Conseil fait appel à un large réseau de plus de 500 experts (professeurs d'université, collaborateurs d'institutions scientifiques), parmi lesquels 200 sont nommés à titre d'expert du Conseil. Les experts se réunissent au sein de groupes de travail pluridisciplinaires afin d'élaborer les avis.

En tant qu'organe officiel, le Conseil Supérieur de la Santé estime fondamental de garantir la neutralité et l'impartialité des avis scientifiques qu'il délivre. A cette fin, il s'est doté d'une structure, de règles et de procédures permettant de répondre efficacement à ces besoins et ce, à chaque étape du cheminement des avis. Les étapes clé dans cette matière sont l'analyse préalable de la demande, la désignation des experts au sein des groupes de travail, l'application d'un système de gestion des conflits d'intérêts potentiels (reposant sur des déclarations d'intérêt, un examen des conflits possibles, et un comité référent) et la validation finale des avis par le Collège (ultime organe décisionnel). Cet ensemble cohérent doit permettre la délivrance d'avis basés sur l'expertise scientifique la plus pointue disponible et ce, dans la plus grande impartialité possible.

Les avis des groupes de travail sont présentés au Collège. Après validation, ils sont transmis au requérant et au ministre de la santé publique et sont rendus publics sur le site internet (www.css-hgr.be), sauf en ce qui concerne les avis confidentiels. Un certain nombre d'entre eux sont en outre communiqués à la presse et aux groupes cibles parmi les professionnels du secteur des soins de santé.

Le CSS est également un partenaire actif dans le cadre de la construction du réseau EuSANH (*European Science Advisory Network for Health*), dont le but est d'élaborer des avis au niveau européen.

Si vous souhaitez rester informé des activités et publications du CSS, vous pouvez vous abonner à une *mailing-list* et/ou un *RSS-feed* via le lien suivant:

<http://www.css-hgr.be/rss>.