

Faculté de Médecine

Année 2021

Thèse N°3145

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 15 septembre 2021

Par Maxime LAFONTAINE

Né(e) le 15 août 1990 à Limoges

Comparaison de l'impact des milieux de vitrification et de réchauffement ovocytaire sur les taux de grossesse en don d'ovocyte.

Thèse dirigée par Madame le Professeur Florence BRUGNON

Examineurs :

Mme. le Professeur Catherine YARDIN.....Présidente du Jury

Mme. le Professeur Florence BRUGNON.....Directrice de thèse

M. le Professeur Nicolas PICARD.....Juge

Mme. le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU.....Juge

Mme. le Docteur Anne-Sophie GREMEAU.....Membre invité

Mme. le Docteur Sophie PAULHAC.....Membre invité

M. le Docteur Jean-Christophe PECH.....Membre invité



Faculté de Médecine

Année 2020

Thèse N°3145

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 septembre 2021

Par Maxime LAFONTAINE

Né(e) le 15 août 1990 à Limoges

Comparaison de l'impact des milieux de vitrification et de réchauffement ovocytaire sur les taux de grossesse en don d'ovocyte.

Thèse dirigée par Madame le Professeur Florence BRUGNON

Examineurs :

Mme. le Professeur Catherine YARDIN.....	Présidente du Jury
Mme. le Professeur Florence BRUGNON.....	Directrice de thèse
M. le Professeur Nicolas PICARD.....	Juge
Mme. le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU.....	Juge
Mme. le Docteur Anne-Sophie GREMEAU.....	Membre invité
Mme. le Docteur Sophie PAULHAC.....	Membre invité
M. le Docteur Jean-Christophe PECH.....	Membre invité



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 7 septembre 2020

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
HOUETO Jean-Luc	NEUROLOGIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE

OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TOURE Fatouma	NEPHROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
KARAM Henri-Hani	MEDECINE D'URGENCE
MOREAU Stéphane	EPIDEMIOLOGIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

BALLOUHEY Quentin	CHIRURGIE INFANTILE
BARRAUD Olivier	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

COUVE-DEACON Elodie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES ASSOCIES A MI-TEMPS

SALLE Laurence	ENDOCRINOLOGIE (du 01-09-2020 au 31-08-2021)
-----------------------	---

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie	(Responsable du département de Médecine Générale)
---------------------------	---

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan	(du 01-09-2019 au 31-08-2022)
LAUCHET Nadège	(du 01-09-2020 au 31-08-2023)
PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule	(du 01-09-2018 au 31-12-2020)
SEVE Léa	(du 01-09-2020 au 31-08-2023)

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul	du 01-09-2017 au 31-08-2021
ALDIGIER Jean-Claude	du 01.09.2018 au 31.08.2020
BESSEDE Jean-Pierre	du 01-09-2018 au 31-08-2020

BUCHON Daniel	du 01-09-2019 au 31-08-2021
MERLE Louis	du 01.09.2017 au 31.08.2020
MOREAU Jean-Jacques	du 01-09-2019 au 31-08-2021
TREVES Richard	du 01-09-2020 au 31-08-2021
TUBIANA-MATHIEU Nicole	du 01-09-2018 au 31-08-2021
VALLAT Jean-Michel	du 01.09.2019 au 31.08.2022
VIROT Patrice	du 01.09.2018 au 31.08.2021

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 12 juin 2020

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

AUDITEAU Emilie	EPIDEMIOLOGIE (CEBIMER)
DAURIAT Benjamin	HISTOLOGIE, EMBRIOLOGIE ET CYTOGENETIQUE
DERBAL Sophiane	CHIRURGIE ANATOMIE
DOUCHEZ Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
DUPONT Marine	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE
DURIEUX Marie-Fleur	PARASITOLOGIE
GUYOT Anne	LABORATOIRE ANAPATHOLOGIE
HERMINEAUD Bertrand	LABORATOIRE ANAPATHOLOGIE
HUMMEL Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LABRIFFE Marc	PHARMACOLOGIE
LEFEBVRE Cyrielle	ANESTHESIE REANIMATION
LOPEZ Stéphanie	MEDECINE NUCLEAIRE
PASCAL Virginie	IMMUNOLOGIE CLINIQUE
PIHAN Franck	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
RIVAILLE Thibaud	CHIRURGIE-ANATOMIE
SANSON Amandine	ANESTHESIE REANIMATION
TCHU HOI NGNO Princia	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ALBOUYS Jérémie	HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE
ARMENDARIZ-BARRIGA Matéo	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBLANC Mathilde	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BAÏSSE Arthur	REANIMATION POLYVALENTE

BEEHARRY Adil	CARDIOLOGIE
BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BRISSET Josselin	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES
CHASSANG-BRUZEAU Anne-Hélène	RADIOLOGIE
CHAUVET Romain	CHIRURGIE VASCULAIRE
CISSE Fatou	PSYCHIATRIE
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DE POUILLY-LACHATRE Anaïs	RHUMATOLOGIE
DESCHAMPS Nathalie	NEUROLOGIE
DESVAUX Edouard	MEDECINE GERIATRIQUE
DUVAL Marion	NEPHROLOGIE
EL OUAFI Zhour	NEPHROLOGIE
FAURE Bertrand	PSYCHIATRIE d'ADULTES
FAYEMENDY Charlotte	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
FROGET Rachel	CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE (pédiatrie)
GEYL Sophie	GASTROENTEROLOGIE
GHANEM Khaled	ORL
GILBERT Guillaume	REANIMATION POLYVALENTE
GUTTIEREZ Blandine	MALADIES INFECTIEUSES
HANGARD Pauline	PEDIATRIE
HARDY Jérémy	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
HESSAS-EBELY Miassa	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
LALOZE Jérôme	CHIRURGIE PLASTIQUE
LEGROS Maxime	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
MAURIANGE TURPIN Gladys	RADIOTHERAPIE

MEUNIER Amélie	ORL
MICLE Liviu-Ionut	CHIRURGIE INFANTILE
MOWENDABEKA Audrey	PEDIATRIE
PARREAU Simon	MEDECINE INTERNE ET POLYCLINIQUE
PELETTE Romain	CHIRURGIE UROLOGIE et ANDROLOGIE
PEYRAMAURE Clémentine	ONCOLOGIE MEDICALE
PLAS Camille	MEDECINE INTERNE B
QUILBE Sébastien	OPHTALMOLOGIE
SIMONNEAU Yannick	PNEUMOLOGIE
SURGE Jules	NEUROLOGIE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
VAIDIE Julien	HEMATOLOGIE CLINIQUE
VERLEY Jean-Baptiste	PSYCHIATRIE ENFANT ADOLESCENT
VIDAL Thomas	OPHTALMOLOGIE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

BERTRAND Adeline

SEVE Léa

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

Néant

A mon grand-père, l'inénarrable Jean Paris.

Remerciements

A Madame le Professeur Catherine Yardin,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Merci pour vos enseignements et pour m'avoir fait découvrir l'embryologie en PACES. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Florence Brugnon,

Je vous remercie pour votre encadrement, votre patience, et votre disponibilité au cours de cette thèse. Je vous remercie également pour votre accueil et votre enseignement au sein du service de Clermont-Ferrand. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Nicolas Picard,

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Croyez-en mes plus sincères remerciements.

A Madame le Docteur Sylvie Bourthoumieu,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que pour vos précieux conseils au cours mon précédent travail. Je vous prie de croire en ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur Anne-Sophie Gremeau,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que pour votre accueil au sein du service de Clermont-Ferrand. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

A Madame le Docteur Sophie Paulhac,

Je ne vous remercierai jamais assez pour m'avoir donné ma chance, pour votre accueil, votre encadrement, vos enseignements et votre patience. Je compte faire de mon mieux pour vous aider à écrire la prochaine page de l'histoire du service. Veuillez trouver en ce travail l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur Jean-Christophe Pech,

Je te remercie également infiniment pour ton accueil, ton encadrement, tes conseils, ta bienveillance, ta bonne humeur, et pour nos tumultueux échanges politiques ! Je te prie de croire en ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

A toute l'équipe du service d'AMP de Limoges, et en premier lieu Malvina, Stéphanie et Audrey, mes trois « mamans » du service (vous l'avez bien mérité) qui ont relu ce travail. Merci de m'avoir appris, guidé, encouragé tout au long de ces semestres, et merci pour tout le reste (que la décence nous interdit de commenter ici). Vous allez enfin pouvoir m'appeler « Junior » ...

Merci à tout le reste de l'équipe : Announ, qui me sauve la vie en permanence, Cécile, Béa et Sandy qui m'expliquent depuis trois semestres où ranger les dossiers (ça va rentrer promis !), aux sage-femmes Marie-Sophie et Stéphanie pour leurs conseils, leurs explications et leur bonne humeur, à toute l'équipe de gynécologie : Monsieur Piver, Lise-Marie, Jérôme, Aurélie, Alix, Nathalie, Marie, Caroline, Marine. A ma co-interne Camille, qui m'a aidé et soutenu dans la bonne humeur pendant ces cinq mois.

Merci à toute l'équipe du service AMP-CECOS de Clermont-Ferrand pour leur accueil : à Laure, Solène, Charlène, Stéphanie et Hanaé pour leurs conseils, leur enseignement et leur patience. A Sylvie et Sabine, pour leur bonne humeur et leur aide inestimable pendant ces six mois. A Cyril, pour ses explications et sa patience. A toute l'équipe du laboratoire et du service : Aurélie, Sandra D et Sandra M, Monique, Isabelle, Gaelle G et Gaelle M, Marion, Roxane, Lydia, Marina, Carole, Pierre, les Sandrines, Candice, Camille, Sarah, Peggy et Isabelle. A mes co-internes Maxime, Issam, Agathe, Leila et Alice, ainsi qu'à Luna pour sa précieuse aide (j'écouterai Angèle en ton honneur) et Marine.

Enfin, un immense merci à ma co-interne de choc, le docteur Jeanne Dufaure qui, contrairement à ce qu'elle vous dira, était bien invitée à ma soutenance. Merci pour les interminables fou rires, les reprises de chansons douteuses, les commérages et le soutien sans faille qui ont rendu ces six mois bien plus simples. « Oui s'il te plait un bonhomme de neige ! ».

A toute l'équipe du service d'Urologie de Limoges, au Professeur Descazeaud, à Xavier, Romain, Yannis, à Joel, à mes co-internes Sybille, Walter, Julien et Victoria, ainsi qu'à tout le personnel du bloc opératoire. Merci pour votre accueil, votre patience, et d'avoir rendu possible et passionnante cette expérience si singulière.

A ma grande famille de biologie de Limoges : aux grimpeurs/coureurs/buveurs de bière : le bon docteur Rateau, Rémy, Sylvain, Catalina et Benjamin le magnifique. A Yohan, qui a une place à part parce que c'est Yohan. A Edouard, qui a sponsorisé nos triglycérides. A Mylène, mon modèle/référence/baby-sitter de l'internat, merci pour ton amitié si précieuse. A Sarah N, Etienne et Alex, merci pour les mêmes, l'humour de forain et les visions post-traumatiques de garde. Aux Winter Théo, Vivi et Etienne, à Caro, Chacha R, Seb, Léa, Cassandra, Marc, Nico, Robin, Sarah M, Maxime R, Wasfi, Marwan, et tous les autres.

A ma famille Clermontoise : Mathieu, Sarah, Tomy, Anne-So, Maïka, Victor, Karen et surtout à Thibert et James, les deux fripouilles qui ont eu la bonne idée de faire leur entrée avant mon départ. Merci pour tous les bons moments, les soirées jeux, les apéros et le soutien pendant ce rude hiver.

Au gang des irrécupérables : Adrien, Nico (qui m'a laissé l'honneur d'être thésé avant lui), Amaury et Romain, et à toutes les années parcourues ensemble... et celles qu'il reste à parcourir ! Aux bien plus respectables Débo, Amélie, Claire et Carine. A la légendaire Claire F*cking Coudert. A Ben Ramine, Sébastien, Nathan et Océane. A Geoffrey, le superbe grathlète. A Chacha, qui aura tenté de m'éliminer un nombre incalculable de fois.

Aux cyclistes Fab et Val, et au petit Léonard, futur vainqueur du Tour de France 2040. A Gaben, bien entendu.

A Axel et Aidan, mes vieux partenaires de crime.

A Guillaume, qui répond toujours présent depuis tant d'années maintenant.

Aux fautes d'orthographe et autres coquilles qui auront réussi à passer les innombrables relectures croisées de ce travail. Félicitations.

A tous ceux que j'oublie et qui vont très certainement m'en vouloir et exercer des représailles.

Enfin, et surtout, à ma famille. A mon frère Paul, ainsi qu'à mon père, ma mère et ma grand-mère. Merci pour votre amour inconditionnel, votre soutien inébranlable, vos sacrifices. Rien de tout cela ne serait possible sans vous. Je vous aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

I. Introduction	20
I.1. L'Assistance Médicale à la Procréation (AMP).....	21
I.1.1. Définition et cadre légal	21
I.1.2. Rappels physiologiques.....	22
I.1.3. La stimulation ovarienne contrôlée	23
I.1.4. La ponction ovarienne	24
I.1.5. La capacitation des spermatozoïdes	24
I.1.6. La fécondation.....	25
I.1.7. Le développement embryonnaire précoce.....	26
I.2. Le don d'ovocytes	27
I.2.1. Principes généraux.....	27
I.2.2. Aspects pratiques	28
I.3. La vitrification ovocytaire.....	30
I.3.1. Principes généraux de cryobiologie	30
I.3.2. La vitesse de congélation	30
I.3.3. Les cryoprotecteurs	32
I.3.4. Congélation lente et vitrification	34
I.3.4.1. La congélation lente	34
I.3.4.2. La vitrification	35
I.3.5. Les supports de vitrification	37
I.3.6. Le réchauffement	39
I.3.7. Comparaison des protocoles	40
II. Objectifs et méthodes.....	45
II.1. Population étudiée et plan expérimental	45
II.2. Protocole de stimulation des donneuses.....	46
II.3. Préparation endométriale des patientes receveuses.....	47
II.4. Protocoles de vitrification et de réchauffement ovocytaire.....	47
II.5. ICSI et culture embryonnaire.....	50
II.6. Transfert embryonnaire et issues de grossesse.....	51
II.7. Critères de jugement.....	51
II.8. Analyses statistiques	52
III. Résultats	53
III.1. Caractéristiques des couples receveurs et donneuses.....	53
III.2. Impact des milieux sur la survie et le développement embryonnaire précoce	56
III.3. Impact des milieux sur les issues de tentatives.....	57
IV. Discussion	59
V. Conclusion	67
Références bibliographiques	68
Serment d'Hippocrate.....	77

Table des illustrations

Figure 1 : cycle ovarien et cycle utérin.....	22
Figure 2 : les trois niveaux de la stimulation ovarienne.....	24
Figure 3 : la première semaine de développement embryonnaire	27
Figure 4 : un cristal de glace structuré à partir d'un motif basal hexamérique	31
Figure 5 : vitesse de refroidissement et lésions cellulaires	32
Figure 6 : exemple de protocole de congélation lente.....	35
Figure 7 : comparaison des méthodes de cryopréservation.....	36
Figure 8 : exemple de protocole de vitrification d'une solution de glycérol et d'eau.....	36
Figure 9 : différents systèmes de support	38
Figure 10 : système fermé Rapid-i™, Vitrolife.	39
Figure 11 : système ouvert VitriFit™, CooperSurgical®.....	39
Figure 12 : nucléation et croissance	40
Figure 13 : protocole de vitrification.....	49
Figure 14 : ovocyte expansé et collapsé.....	49
Figure 15 : protocole de réchauffement.	50
Figure 16 : indications de recours au don d'ovocytes	54
Figure 17 : répartition des protocoles de blocage de l'ovulation utilisés pour les donneuses	55
Figure 18 : transfert d'embryon réalisé au stade précoce (J2) ou tardif (J5)	58

Table des tableaux

Tableau 1 : principaux milieux de vitrification disponibles sur le marché.....	42
Tableau 2 : revue des milieux et supports utilisés pour la vitrification des ovocytes.....	43
Tableau 3 : milieux de vitrification employés.....	45
Tableau 4 : composition et conditions d'utilisation des milieux pour chaque protocole de vitrification ovocytaire utilisé.	48
Tableau 5 : composition et temps d'incubation des bains de réchauffement.....	50
Tableau 6 : caractéristiques des couples receveurs	53
Tableau 7 : données relatives à la population des donneuses.....	55
Tableau 8 : caractéristiques du développement embryonnaire précoce après ICSI avec les ovocytes réchauffés pour les couples receveurs	56
Tableau 9 : issues des tentatives après transfert frais.	57
Tableau 10 : principaux résultats rapportés dans la littérature	61

I. Introduction

L'assistance Médicale à la Procréation (AMP) est l'ensemble des pratiques cliniques et biologiques permettant la conception *in vitro*, la conservation des gamètes, des tissus germinaux et des embryons, le transfert d'embryons et l'insémination artificielle (1).

La première naissance obtenue par fécondation *in vitro* (FIV) date de 1978 (2). Depuis, le domaine a connu une expansion spectaculaire au gré des avancées de la recherche, de la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'infertilité, des progrès technologiques et des évolutions sociétales. Néanmoins l'histoire de l'AMP est antérieure à celle de la FIV et s'adosse au développement dans le courant du XXe siècle des techniques d'insémination artificielle, ainsi qu'à la recherche de la préservation des tissus gamétiques.

En effet, cette histoire est intimement liée à celle de cryobiologie, dont les applications pratiques ont révolutionné l'industrie de l'élevage dans la deuxième moitié du XXe siècle avec la maîtrise de la cryopréservation du sperme de bovin. L'application à l'espèce humaine se développa en parallèle : dès 1953, la première grossesse après insémination de sperme congelé était obtenue (3).

Ces progrès ont permis l'essor de l'activité de don de gamètes, en rendant possible la constitution dès les années 1970 de banques de sperme, permettant l'attribution de spermatozoïdes issus d'un même prélèvement à plusieurs receveuses. En France, cette activité s'est structurée autour des Centres d'Etudes et de Conservation des Œufs et du Sperme humain (CECOS). Fondé par Georges David en 1973, l'objectif du premier CECOS était de proposer un cadre éthique pluridisciplinaire autour du don, en imposant les principes d'anonymat et de gratuité (4). Dès les années suivantes, plusieurs autres centres furent fondés en France et s'organisèrent en 1981 en fédération des CECOS, dont l'objectif est le développement et l'harmonisation des pratiques autour du don, le développement de la recherche et la promotion de cette activité auprès des instances et du grand public (4). Initialement constituée autour du don de sperme, l'activité des CECOS s'est, avec le développement de la stimulation ovarienne et de la FIV, étendue au don d'ovocytes (DO) et à l'accueil d'embryons (AE). Toutefois, la maîtrise et l'introduction en routine de la cryopréservation des embryons et des ovocytes fut plus tardive que celle des spermatozoïdes, en particulier pour l'ovocyte. Bien que la première grossesse (suivie d'une naissance de jumeaux) après fécondation d'ovocytes congelés fut obtenue en 1986 (5), les résultats de la congélation ovocytaires furent initialement médiocres et cette technique éclipsée au profit de la congélation embryonnaire (6,7). Néanmoins, la congélation embryonnaire ne pouvait satisfaire aux exigences de préservation de fertilité de la femme seule, ni aux exigences éthiques des pays interdisant la conservation embryonnaire. De fait, les protocoles de congélation ovocytaires furent progressivement améliorés au cours des années 90 jusqu'à l'aboutissement d'une avancée technique majeure dans le domaine de la cryobiologie : la vitrification, permettant de cryoconserver efficacement ovocytes et embryons grâce à un refroidissement ultra-rapide et l'utilisation de cryoprotecteurs à concentrations élevées (8–11).

La vitrification a été autorisée dans la pratique de routine en France à partir de 2011 (12,13). Dans le service AMP-CECOS de Clermont-Ferrand, fondé en 1982, l'activité de don d'ovocytes était réalisée avant cette date en don d'ovocyte synchrone, c'est-à-dire sans étape de cryoconservation ovocytaires. Depuis février 2013, l'autorisation de la vitrification a permis la transformation de cette activité dans notre centre en don dit asynchrone, par l'intermédiaire d'une banque d'ovocytes vitrifiés. Depuis l'introduction de cette technique, trois générations

de kits commerciaux associant des milieux de vitrification et des milieux de réchauffement ont été employées successivement dans le centre, au gré des évolutions proposées par le fournisseur et de l'optimisation des techniques employées. L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer les résultats obtenus en termes de taux de grossesse suite à l'utilisation de ces trois kits de vitrification/réchauffement ovocytaire pour la prise en charge en DO au CECOS de Clermont-Ferrand sur la période de janvier 2014 à juillet 2020.

I.1. L'Assistance Médicale à la Procréation (AMP)

I.1.1. Définition et cadre légal

L'Assistance Médicale à la Procréation s'entend comme l'ensemble des pratiques cliniques et biologiques permettant la conception *in vitro*, la conservation des gamètes, des tissus germinaux et des embryons, le transfert d'embryons, l'insémination artificielle (1).

Son champ d'application défini par les lois de bioéthique applicables à l'heure de l'écriture de ce travail s'étend à (14):

- L'exploration diagnostique et l'assistance thérapeutique aux couples en situation d'infertilité (avec utilisation des gamètes en intra-couple ou avec don de gamètes).
- L'assistance médicale aux couples exposés au risque de transmission d'une maladie particulièrement grave :
 - A l'autre membre du couple (maladies infectieuses)
 - A l'enfant (maladies génétiques)
- La préservation de fertilité des individus exposés à des situations potentiellement stérilisantes.

Son exercice en France est réglementé par les règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation, arrêtées en 2008 et révisées en 2017 et par les lois de bioéthique, dont la première version fut établie en 1994 (15,16).

Ces lois sont réévaluées périodiquement, avec deux révisions actées en 2004 et 2011 et une troisième révision dont l'adoption est prévue pour l'année 2021 (13,17,18). Ces vagues de réévaluations permettent l'adaptation de l'exercice à l'avancée rapide des progrès techniques et des changements sociétaux.

En France, les couples pouvant bénéficier d'une prise en charge en AMP sont des couples composés d'un homme et d'une femme vivants, en âge de procréer et consentants au transfert des embryons ou à l'insémination. Ces conditions sont susceptibles de changer avec l'adoption du projet de révision des lois de bioéthique en 2021 (18).

I.1.2. Rappels physiologiques

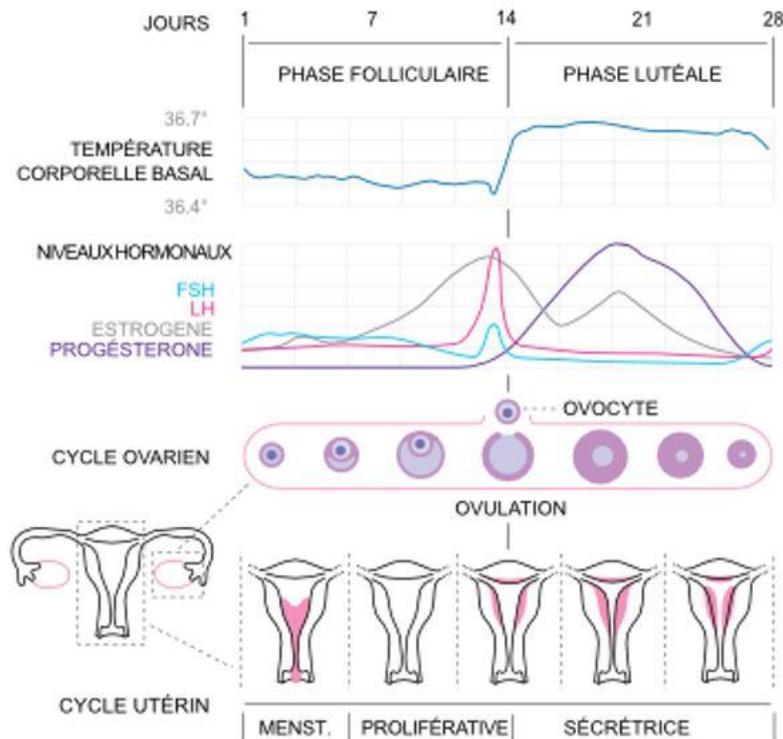


Figure 1 : cycle ovarien et cycle utérin

Source : Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français (CNGOF) (19)

Le cycle ovarien a une durée de 28 jours. Il débute le premier jour des règles en lien avec l'absence de nidation embryonnaire (20).

Le premier jour des règles marque le début de la phase folliculaire, de longueur variable d'une patiente à l'autre, classiquement évaluée à 14 jours, marquée au départ par l'ouverture de la « fenêtre de FSH ». L'augmentation des taux circulants de FSH va provoquer la croissance des follicules antraux via les récepteurs de la granulosa. Le follicule dont la sensibilité à la FSH est la plus élevée présente un seuil de réponse plus bas et donc une croissance plus rapide que les autres : il s'agit du follicule dominant ou follicule de De Graaf (20). En réponse à la sécrétion de FSH, les cellules de la granulosa vont sécréter des œstrogènes qui vont contribuer à l'épaississement de la muqueuse endométriale. L'augmentation des taux d'œstrogènes va ensuite provoquer la « fermeture de la fenêtre » par rétro-contrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (20). La diminution de sécrétion de FSH conduit alors à l'atrophie de tous les follicules sauf un : le follicule dominant. Celui-ci continue à se développer, en sécrétant une quantité de plus en plus importante d'œstradiol, jusqu'à l'atteinte d'un seuil critique (20). Ce seuil critique correspond à une bascule de la régulation endocrine des œstrogènes vers le rétro-contrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (20). Il en résulte une sécrétion brutale de LH ou « pic » de LH. Ce pic de LH va agir sur l'ovocyte en réactivant son processus de division cellulaire : l'ovocyte quiescent bloqué jusqu'alors en prophase I va reprendre la méiose et accomplir la division réductionnelle pour s'arrêter au début de la métaphase II, après expulsion du premier globule polaire (21). On obtient alors un ovocyte dit « mature », condition obligatoire pour la fécondation. Par ailleurs, l'action de la LH sur les

cellules de la thèque va provoquer la rupture du follicule et l'expulsion du complexe cumulo-ovocytaire (CCO) vers le pavillon de la trompe lors de l'ovulation, dans les 36 heures après le début du pic de LH (22). L'ovulation marque le début de la phase lutéale, pour une durée fixe de 14 jours. Les cellules de la granulosa et de la thèque subissent une lutéinisation sous l'influence de la LH et transforment les restes du follicule dominant en corps jaune, sécrèteur de progestérone (20). Cette sécrétion de progestérone importante va induire une augmentation de l'épaisseur de l'endomètre, le préparant à la nidation. Pendant ce temps, l'ovocyte entouré de la *corona radiata* et du *cumulus oophorus* est transporté de la trompe vers l'utérus. En cas de rapport sexuel la fécondation peut alors se produire dans le tiers distal de la trompe (23). À la suite de la fécondation, un embryon se développe et parvient dans la cavité utérine vers le troisième jour du développement et va s'implanter dans l'endomètre vers le cinquième jour du développement (24). Son implantation entraîne la sécrétion de β -HCG qui maintient le corps jaune et permet la poursuite de la grossesse. En l'absence de nidation, les cellules du corps jaune s'atrophient et le taux de progestérone s'effondre, entraînant l'apparition des règles et le début d'un nouveau cycle (25).

I.1.3. La stimulation ovarienne contrôlée

Nous venons de voir que le cycle ovarien physiologique aboutit en théorie à l'ovulation d'un seul ovocyte sélectionné. Pour la prise en charge en AMP, une stimulation hormonale de la croissance folliculaire sera nécessaire afin de recruter et recueillir une cohorte d'ovocytes matures pour optimiser les chances de grossesse. Le traitement de stimulation de l'ovulation a pour objectif d'inhiber l'atrophie folliculaire, dans le but de parvenir à la croissance de plusieurs follicules contenant des ovocytes dit matures.

La stimulation ovarienne contrôlée repose sur une intervention à trois niveaux (figure 2) :

- Une administration de FSH exogène est réalisée afin d'obtenir la croissance des follicules. Ceci est réalisé par injection quotidienne de FSH recombinante ou de ménotropines (HMG), au moyen de stylos pré-calibrés (26).
- Cette administration va provoquer le développement de multiples follicules simultanément. En conséquence, une élévation supra-physiologique des seuils d'œstradiol est observée. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'élévation du niveau d'œstradiol va entraîner le déclenchement de l'ovulation : il est donc nécessaire de prévenir ce déclenchement avant l'obtention de plusieurs follicules matures. La deuxième étape consiste donc à bloquer l'ovulation. Ceci peut s'effectuer de deux façons : via l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à la LH-RH (cétrorélix, ganirélix) ou par l'utilisation d'agonistes à ces mêmes récepteurs (triptoréline) (26).

Enfin, le blocage est temporaire car l'ovulation est nécessaire pour induire la reprise en méiose et donc la maturation de l'ovocyte. La croissance des follicules est monitorée au cours de la stimulation par échographie, afin de contrôler leur nombre, leur taille et leur localisation. Une fois un nombre suffisant de follicules de taille satisfaisante obtenu, la troisième étape consiste alors à déclencher l'ovulation. Les molécules utilisées induisent un pic d'activité LH ou LH-like. Ce déclenchement est réalisé par l'injection d'HCG (qui possède une affinité importante pour les récepteurs à la LH, avec une demi-vie longue) ou par la triptoréline (qui va induire une sécrétion de LH endogène) (26).

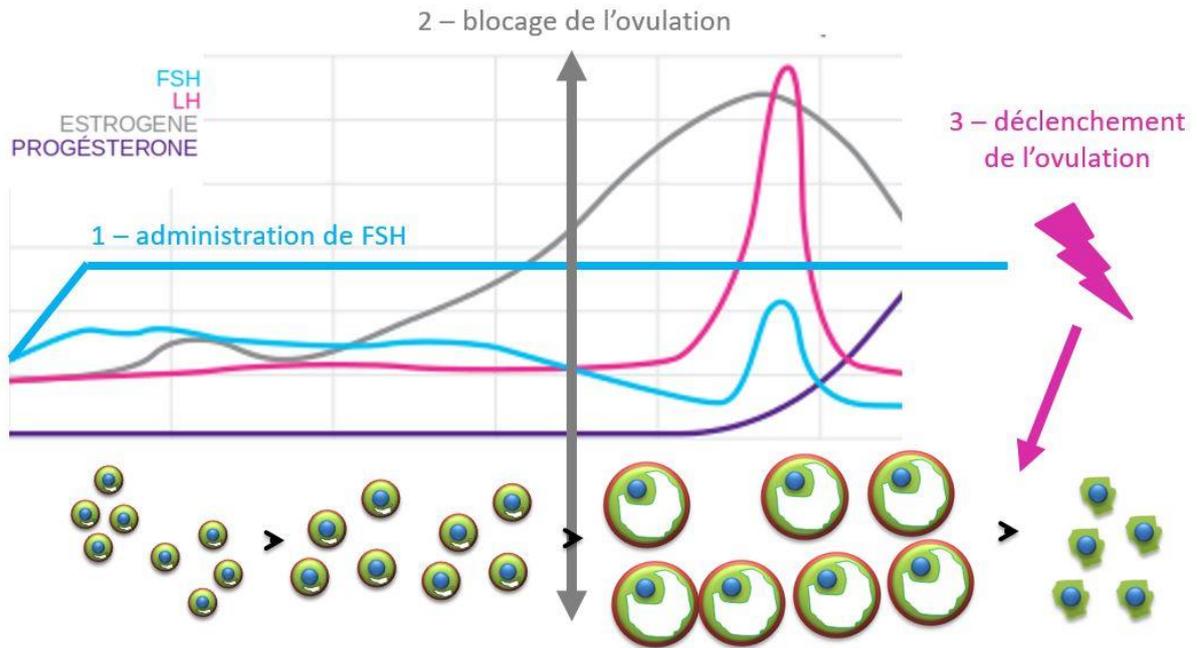


Figure 2 : les trois niveaux de la stimulation ovarienne
Source : CNGOF (modifié par l'auteur)

A l'issue du déclenchement de l'ovulation, les ovocytes sont prêts à être recueillis lors de la ponction ovarienne.

I.1.4. La ponction ovarienne

Trente-cinq heures après l'injection de déclenchement, la patiente est prise en charge au niveau du bloc opératoire pour réaliser la ponction (26). Il s'agit d'un geste chirurgical réalisé sous échoguidage. Il peut être réalisé sous anesthésie locale, sous sédation profonde ou sous anesthésie générale.

L'objectif est d'aspirer le contenu des follicules ovariens à l'aide d'une aiguille montée sur une sonde d'échographie endovaginale. La sonde est amenée au niveau du cul de sac vaginal en regard de l'ovaire et l'aiguille vient traverser la paroi du cul de sac en direction du ou des follicules. Le gynécologue peut alors aspirer le ou les follicules repéré(s) par échographie. Ceux-ci sont recueillis au sein d'un tube préalablement rempli de milieu de recueil ovocytaire, maintenu à une température de 37°C. (26) Une fois l'ensemble des follicules repérés drainés, la sonde est retirée et le liquide adressé au laboratoire pour recueil des complexes.

Les ovocytes recueillis en vue de don sont ensuite vitrifiés puis réchauffés le jour de la tentative du couple receveur. Nous aborderons ces points ultérieurement.

I.1.5. La capacitation des spermatozoïdes

Le jour de la tentative, le conjoint de la patiente receveuse se présente au laboratoire pour effectuer un recueil de sperme. Ce recueil ne peut être utilisé en état pour la fécondation : les spermatozoïdes doivent d'abord passer par un processus dit de « capacitation ». La capacitation s'entend des phénomènes de modifications membranaires et intracellulaires permettant aux spermatozoïdes d'acquérir leur pouvoir fécondant, au travers de l'élimination

des protéines du plasma séminal et de l'interaction avec l'environnement du tractus génital féminin (23). *In vivo*, ce processus démarre au niveau de la glaire cervicale : les spermatozoïdes y sont débarrassés du plasma séminal et la structure en réseau de la glaire joue un rôle de filtre pour les spermatozoïdes anormaux et/ou de mobilité réduite (23).

Ce processus de capacitation et sélection est reproduit *in vitro* au laboratoire, au travers de la réalisation d'un test de sélection ou test de migration-survie (TMS). Le principe est de faire passer les spermatozoïdes par centrifugation au sein d'un réseau de microbilles de silice, ce qui va permettre de les séparer du plasma séminal ainsi que de trier ceux qui présentent des anomalies morphologiques ou de mobilité, incapables de manœuvrer au travers du réseau (27). Les spermatozoïdes ayant réussi à traverser le gradient sont ensuite repris dans un milieu dit de capacitation qui contribue à leur processus d'activation (27,28).

La préparation ainsi obtenue permet de procéder à l'étape suivante : la fécondation.

I.1.6. La fécondation

La fécondation est le processus de rencontre des gamètes, permettant d'aboutir à la formation d'un zygote.

In vivo, ce processus intervient généralement au niveau du tiers distal de la trompe utérine. Les spermatozoïdes sélectionnés vont pénétrer les cellules de la *corona radiata* grâce à leur mobilité activée dite fléchante. Progressivement, les spermatozoïdes vont pénétrer de plus en plus profondément, jusqu'à ce que l'un d'entre eux entre en contact avec la zone pellucide (ZP) de l'ovocyte. La tête du spermatozoïde va se lier à celle-ci via les récepteurs de liaison ZP3 et ZP4, ce qui déclenche l'exocytose du contenu de l'acrosome : c'est la réaction acrosomiale. Celle-ci permet la lyse de la ZP par les enzymes acrosomiales d'une part et la mise à nu des protéines de la région équatoriale du spermatozoïde qui vont permettre une liaison secondaire irréversible de la cellule à la ZP. Ces deux mécanismes permettent l'intériorisation du spermatozoïde dans l'espace péri-vitellin et la fusion des membranes plasmiques des gamètes. A l'issue de ce processus, l'ovocyte s'active : il termine le processus de méiose, aboutissant à l'extériorisation du deuxième globule polaire et procède à la réaction corticale. Celle-ci correspond à des modifications de la zone pellucide interdisant toute nouvelle liaison d'un spermatozoïde, permettant le blocage de la polyspermie (23).

Ce processus peut être reproduit *in vitro*, par fécondation *in vitro* classique ou FIVc. Les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) sont placés dans une boîte au sein d'un milieu adéquat et plusieurs milliers de spermatozoïdes capacités sont déposés au contact des CCO. Les gamètes sont alors laissés en incubation pendant plusieurs heures au sein d'une étuve, dans des conditions de cultures à température et pH adaptés, sans nouvelle intervention. Passé un délai allant de trois heures à vingt-quatre heures selon les équipes, les ovocytes sont débarrassés des cellules de la granulosa restantes par décoronisation mécanique à la pipette puis mis en culture dans un milieu de culture adapté (26).

Dans le cadre du don d'ovocyte, un autre type de fécondation est habituellement préféré à la FIVc : la fécondation *in vitro* par injection intra-cytoplasmique de sperme (ICSI).

Cette technique récente, pour laquelle la première naissance fut obtenue en 1992 (29), implique l'injection d'un spermatozoïde directement au sein du cytoplasme de l'ovocyte. Les ovocytes réchauffés sont disposés au sein d'une boîte de Petri, dans un milieu de culture tamponné. Un dépôt de spermatozoïdes préparés est également réalisé au sein de la boîte et celle-ci est placée sur un microscope équipé d'un système de micromanipulation. Ce système,

équipé de deux pipettes, permet l'observation, la sélection et l'injection directe d'un unique spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte. Ce processus est répété pour chaque ovocyte disponible. Ceux-ci sont ensuite déposés dans un milieu de culture et placés au sein d'une enceinte thermostatée pour mise en culture embryonnaire. L'utilisation de l'ICSI est préférée à celle de la FIVc dans le cadre du don d'ovocytes car le processus de vitrification/réchauffement peut induire des modifications de la composition de la zone pellucide, compromettant les chances de fécondation en FIVc (30). L'ICSI permet ainsi de contourner cet éventuel obstacle et permet de garantir un taux de fécondation satisfaisant.

I.1.7. Le développement embryonnaire précoce

Le développement embryonnaire précoce désigne la succession de transformations que subit l'ovocyte fécondé pour aboutir à l'embryon pré-implantatoire au cours de la première semaine de développement (24).

Après l'ICSI, les ovocytes micro-injectés sont placés dans un milieu de culture adéquat au sein d'une enceinte permettant la stabilité des paramètres de température et de pH du milieu.

Au cours de la culture *in vitro*, l'embryon se développe jusqu'à atteindre son stade pré-implantatoire : le blastocyste. Il doit ensuite s'implanter pour poursuivre son développement. Ainsi, l'embryon est conservé *in vitro* jusqu'à six jours au maximum : il est alors soit transféré dans l'utérus, soit congelé pour transfert ultérieur, soit détruit. Le transfert se fait classiquement à J2-J3 ou J5-J6 : la durée de la culture dépend des stratégies de transfert du centre (26).

La première semaine de développement inclut les étapes suivantes (24) (figure 3) :

- Dans les premières heures de développement, l'ovocyte achève sa deuxième division de méiose avec l'expulsion du deuxième globule polaire. Le matériel nucléaire des gamètes se décondense et commence à se répliquer au sein des deux pronuclei avec la formation d'un zygote 18 heures après la décondensation. Les pronuclei maternel et paternel vont se réunir : c'est la syngamie. Après cet événement, la première division cellulaire s'amorce et donne naissance à deux cellules-filles. Le zygote passe alors au stade d'embryon dit « clivé ».
- Du deuxième au troisième jour du développement, les mitoses se poursuivent pour aboutir aux stades quatre cellules puis huit cellules, attendus respectivement à J2 et J3. Les cellules (appelées blastomères) sont alors totipotentes. Des critères morphologiques sont évalués pour définir si l'embryon a des chances élevées de s'implanter ou non : nombre de cellules, symétrie de celles-ci et présence de fragmentation cellulaire résiduelle aux divisions (31). Le caractère « top » de l'embryon permet de désigner un embryon qui a une chance significativement plus élevée d'atteindre le stade de blastocyste. Enfin, il est possible de transférer l'embryon dans la cavité utérine ou de le congeler à ce stade.
- Le troisième et le quatrième jour voient l'embryon continuer à se développer et atteindre le stade 32 cellules ou morula. C'est à ce moment qu'intervient une étape clé du développement embryonnaire : la compaction. Celle-ci correspond à l'activation du génome propre de l'embryon (et par extension du génome paternel) : jusque-là, celui-ci se reposait sur les réserves énergétiques et les transcrits préparés par l'ovocyte (génome maternel). A partir de la compaction, l'embryon est capable de transcrire son propre génome et développer son propre métabolisme. Ceci aboutit également au

premier stade de différenciation cellulaire : deux populations cellulaires se constituent et établissent des jonctions serrées et des jonctions communicantes. Ces deux populations cellulaires vont donner le trophoblaste, précurseur des annexes et la masse cellulaire interne (MCI), précurseur du fœtus.

- Du quatrième au cinquième jour, une cavité liquidienne se développe au sein de l'embryon compacté : le blastocèle. Son apparition définit l'entrée de la cellule au stade blastocyste, correspondant au stade implantatoire de l'embryon. Ceci coïncide *in vitro* avec l'arrivée de l'embryon dans l'utérus, à un stade où l'endomètre est à son maximum de réceptivité. Parallèlement à la croissance de la MCI et du trophoblaste, l'expansion du blastocèle va exercer une pression sur la zone pellucide qui aboutit à sa rupture et à l'éclosion du blastocyste. Cette éclosion est nécessaire à l'adhésion du trophoblaste à la muqueuse pour permettre l'implantation ; il s'agit alors du dernier stade possible de développement *in vitro*. A ce stade, le blastocyste est évalué selon des critères morphologiques pronostiques de ses chances d'implantation et de développement, puis transféré dans la cavité utérine, congelé pour transfert ultérieur ou détruit. L'évaluation de l'embryon à J5 repose sur la classification du blastocyste de Gardner et Schoolcraft (32). Les blastocystes étaient évalués selon :
 - Le stade de développement du blastocèle (B1 à B6)
 - La qualité du développement de la masse cellulaire interne (A, B ou C)
 - La qualité du développement du trophoblaste (A, B ou C)

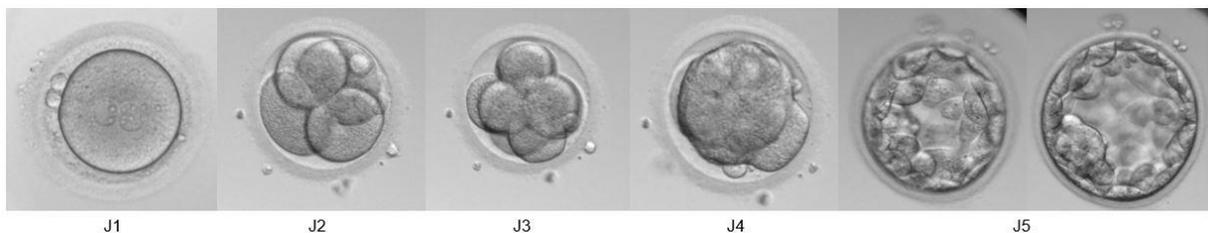


Figure 3 : la première semaine de développement embryonnaire
Source : laboratoire AMP-CECOS, CHU Estaing, Clermont-Ferrand

Le transfert utérin peut être réalisé à J2, J3, J5 ou J6 selon le choix des équipes. Il implique une préparation endométriale chez la patiente receveuse, obtenue par réalisation d'un cycle de stimulation simple, avec administration d'un traitement soutien de la phase lutéale, classiquement à base de progestérone.

I.2. Le don d'ovocytes

I.2.1. Principes généraux

Le don d'ovocytes s'inscrit en France dans la démarche globale du don de gamètes. Celui-ci s'entend en l'apport par un tiers de spermatozoïdes ou d'ovocytes en vue d'une assistance médicale à la procréation (33).

Alors que le don de sperme est apparu au début vers le début de la deuxième moitié du XXe siècle, le don d'ovocyte est plus récent et associé au développement de la FIV. C'est pourquoi la première grossesse issue de don d'ovocyte ne fut obtenue qu'en 1983 (34).

L'accès au don d'ovocytes en France est règlementé depuis juillet 1994 (33) par la Loi relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal, révisée en 2004 et 2011 par les lois dites de Bioéthique (13,17). Le don de gamètes est encadré par l'Agence de la Biomédecine et le parcours des donneuses ainsi que l'attribution des gamètes sont principalement administrés par les Centres d'Etude et de Conservation de l'œuf et du Sperme humain (CECOS).

Le don de gamètes en France repose sur trois principes fondamentaux : le volontariat, la gratuité et l'anonymat (33,35,36).

- Le don est volontaire, soumis au consentement éclairé de la donneuse.
- Le don est gratuit, c'est-à-dire que la donneuse ne peut et ne doit pas être rémunérée pour son geste. Néanmoins, il peut exister une prise en charge financière des frais avancés pour le don (indemnités kilométriques, garde d'enfants...)
- L'anonymat de la donneuse vis-à-vis du couple receveur et de l'enfant issu du don. Une révision de ce principe est envisagée dans le projet de Loi relative à la Bioéthique de 2021. Cette révision maintient l'anonymat entre le donneur et le couple receveur, mais garantit désormais aux personnes conçues par AMP la possibilité d'accéder aux données identifiantes ou non identifiantes du tiers donneur à leur majorité (18).

La place du don d'ovocyte dans l'activité d'AMP en France reste faible, bien qu'en progression sur les dernières années : en 2018, 343 enfants naissaient après don d'ovocyte, soit 1.5% des naissances en AMP (37). Ce chiffre est en augmentation depuis 2016, en relation avec l'augmentation du nombre de donneuses consécutive à l'ouverture du don aux femmes n'ayant pas encore procréé.

Cette proportion faible du recours au don s'explique d'une part par des indications précises :

- L'insuffisance ovarienne avec aménorrhée : idiopathique, d'origine génétique (syndrome de Turner par exemple), liée à un traitement gamétotoxique (radio- ou chimiothérapie) ou chirurgical.
- Les échecs d'AMP intra-couple à sperme *a priori* normal.
- Les indications génétiques avec risque de transmission d'une maladie particulièrement grave et incurable.

Elle s'explique également par le nombre faible de donneuses : en 2018, 777 prélèvements d'ovocytes aboutissaient à un don, pour un nombre de couples sur liste d'attente évalué à environ 2800. Alors qu'en 2015/2016, le nombre de nouvelles demandes était en relatif équilibre avec le nombre de couples ayant bénéficié d'un don dans l'année, le nombre de couples demandeurs a dépassé le nombre de couples bénéficiaires en 2017 (1288 vs. 1137 en 2018).

I.2.2. Aspects pratiques

Les parcours de don d'ovocytes sont classés en parcours de don synchrone et asynchrone.

Le don d'ovocytes synchrone permet la mise en relation directe des ovocytes avec les spermatozoïdes du couple receveur sans passer par une étape de congélation potentiellement

délétère pour les ovocytes. La stimulation de la donneuse aboutit à la ponction ovocytaire, avec mise en fécondation « immédiate » des ovocytes recueillis par ICSI, mise en culture embryonnaire et transfert utérin. Ceci implique néanmoins une synchronisation du cycle de la donneuse avec celui de la receveuse, pour laquelle la fenêtre implantatoire de l'endomètre doit être obtenue entre J2 et J5 de développement embryonnaire.

De fait, le don frais présente plusieurs inconvénients :

- La réalisation d'une synchronisation des cycles entre la donneuse et la receveuse n'est pas forcément aisée.
- Si un nombre insuffisant d'ovocytes matures est obtenu le jour du recueil, il expose le couple receveur à une diminution de chances de grossesses. En l'absence complète d'ovocytes matures, le risque est alors l'arrêt de la tentative. Ceci est particulièrement problématique pour les attributions multiples, où deux couples receveurs sont attribués à une même donneuse.
- Enfin, le don synchrone peut constituer une vulnérabilité dans le parcours d'anonymat, en réunissant dans un même endroit et dans une fenêtre de temps restreinte la donneuse et le couple receveur.

Historiquement, les parcours de don étaient plus souvent synchrones en raison du manque de fiabilité de la congélation ovocytaire. Néanmoins, l'essor de la vitrification et de ses résultats très prometteurs ont permis le développement d'une stratégie alternative : le don asynchrone (38).

Dans cette situation, les ovocytes de la donneuse sont vitrifiés et conservés à l'issue de la ponction et le centre de don peut réaliser l'attribution à une date ultérieure en fonction des demandes en cours des couples receveurs. Il suffit alors de réchauffer les ovocytes et procéder à une ICSI avec les spermatozoïdes de l'homme du couple receveur.

Ceci permet donc de lever les inconvénients majeurs du don synchrone : la stimulation ovarienne peut être réalisée selon les disponibilités de la donneuse et de la receveuse, l'échec de récupération d'ovocytes matures chez la donneuse n'a plus de conséquence directe envers le couple receveur et l'anonymat est préservé en permettant le cloisonnement spatial et temporel du don et de la tentative d'AMP. Par ailleurs, la congélation permet la mise en quarantaine sanitaire des prélèvements (39).

Toutefois, le don d'ovocytes congelés a introduit un inconvénient majeur : le risque de lyse des ovocytes lors du processus de vitrification/réchauffement. Ceci aboutit à une diminution du nombre d'ovocytes disponibles pour le couple receveur. Ce nombre d'ovocyte disponibles étant corrélé aux chances de grossesse (40), la conséquence en est une perte de chances vis-à-vis du don synchrone. Cet écueil semble cependant moins important pour les ovocytes vitrifiés que pour les ovocytes conservés par congélation lente (41).

I.3. La vitrification ovocytaire

I.3.1. Principes généraux de cryobiologie

On entend par congélation les techniques visant à faire passer un liquide à un état solide par refroidissement (42). L'utilisation de la glace pour conserver les aliments est ancestrale et depuis le développement de la réfrigération artificielle dans la deuxième moitié du XIXe siècle, l'idée de conserver des tissus animaux et humains (dont les gamètes) s'est rapidement développée.

Le principe général consiste à utiliser le froid pour bloquer temporairement les activités biologiques par abaissement de la température en dessous du point de fusion de l'eau. La diminution du mouvement moléculaire ainsi obtenue permet une inhibition des réactions chimiques et enzymatiques intracellulaires et de ce fait une « mise en pause » du métabolisme (43). De nos jours, la température de conservation employée pour le stockage à long terme est celle de l'azote liquide (LN2), soit -196°C (7).

Les objectifs de la congélation cellulaire sont :

- L'arrêt réversible du métabolisme.
- Le maintien de l'intégrité cellulaire aux très basses températures.
- Le maintien de l'intégrité du génome (au niveau chromosomique et épigénétique).

Les avancées en cryobiologie datent majoritairement du XXe siècle : la première congélation lente de sperme animal remonte à 1949 et d'un embryon de mammifère à 1972 (44,45). Pour l'humain, la première congélation lente de sperme remonte à 1953 et les premières naissances après congélation d'un embryon et d'un ovocyte datent respectivement de 1983 et 1986 (46–48). La vitrification, processus étudié en parallèle, apparaît dès les années 80 avec une première naissance sur embryon vitrifié en 1990 et sur ovocyte vitrifié en 1999 (9,49). Son emploi en routine n'est autorisé en France qu'en 2011 (12,13).

La congélation lente et la vitrification sont les deux techniques les plus utilisées en AMP de nos jours. Elles reposent sur des principes fondamentaux communs que nous allons aborder.

I.3.2. La vitesse de congélation

La congélation d'un tissu ou de cellules implique la formation de glace dans le milieu. L'abaissement de la température permet la formation de liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau adjacentes. Ces liaisons induisent la formation d'une structure stable et organisée, classiquement à partir d'un motif hexaédrique : il s'agit du cristal de glace (50) (figure 4).

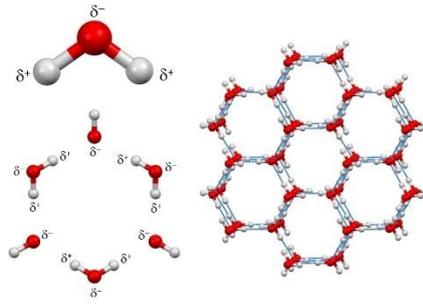


Figure 4 : un cristal de glace structuré à partir d'un motif basal hexamérique. Les molécules d'eau sont reliées aux molécules avoisinantes par des liaisons hydrogènes. Source (51)

Le développement de ces cristaux dans un milieu de conservation a un impact péjoratif sur la survie des cellules. En 1972, Mazur formulait une double hypothèse sur les mécanismes principaux des lésions liées à la congélation (52) :

- Les cristaux de glace *extracellulaires*, formés pour des vitesses de congélation lentes, excluent les solutés présents dans le milieu. Dès lors, la formation de cristaux dans une solution entraîne une concentration progressive des solutés dans la fraction résiduelle d'eau liquide où baignent les cellules à préserver. Ceci aboutit à un stress hyperosmotique : une fois les mécanismes de résistance des cellules à cette hypertonicité dépassés, les ions vont progressivement pénétrer la cellule et être responsables d'une toxicité intracellulaire, aboutissant à la lyse de la cellule. Ce mécanisme fut mis en évidence dès les années 1950 par Lovelock qui identifie le chlorure de sodium comme élément majeur responsable de ce choc (53). Ce phénomène est d'autant plus important que la vitesse de refroidissement est lente.
- D'autre part, la formation de cristaux de glace *intracellulaires*, formés lors des descentes en température rapides, aboutit à une destruction de l'architecture de la cellule et notamment du cytosquelette. Ce phénomène est peu observé à des vitesses de refroidissement basses, car la cellule va se déshydrater progressivement en réponse à l'hyperosmolarité extérieure. En revanche, à des vitesses de refroidissement très importantes où la déshydratation cellulaire ne peut se faire progressivement, on peut observer une cristallisation de l'eau intracellulaire et une diminution de la survie cellulaire.

Ainsi, il se dégage de l'hypothèse de Mazur qu'il existe une vitesse de refroidissement optimale, permettant de limiter à la fois la prolifération de cristaux extracellulaires (et l'hyperosmolarité résultante) et la prolifération de cristaux intracellulaires (figure 5).

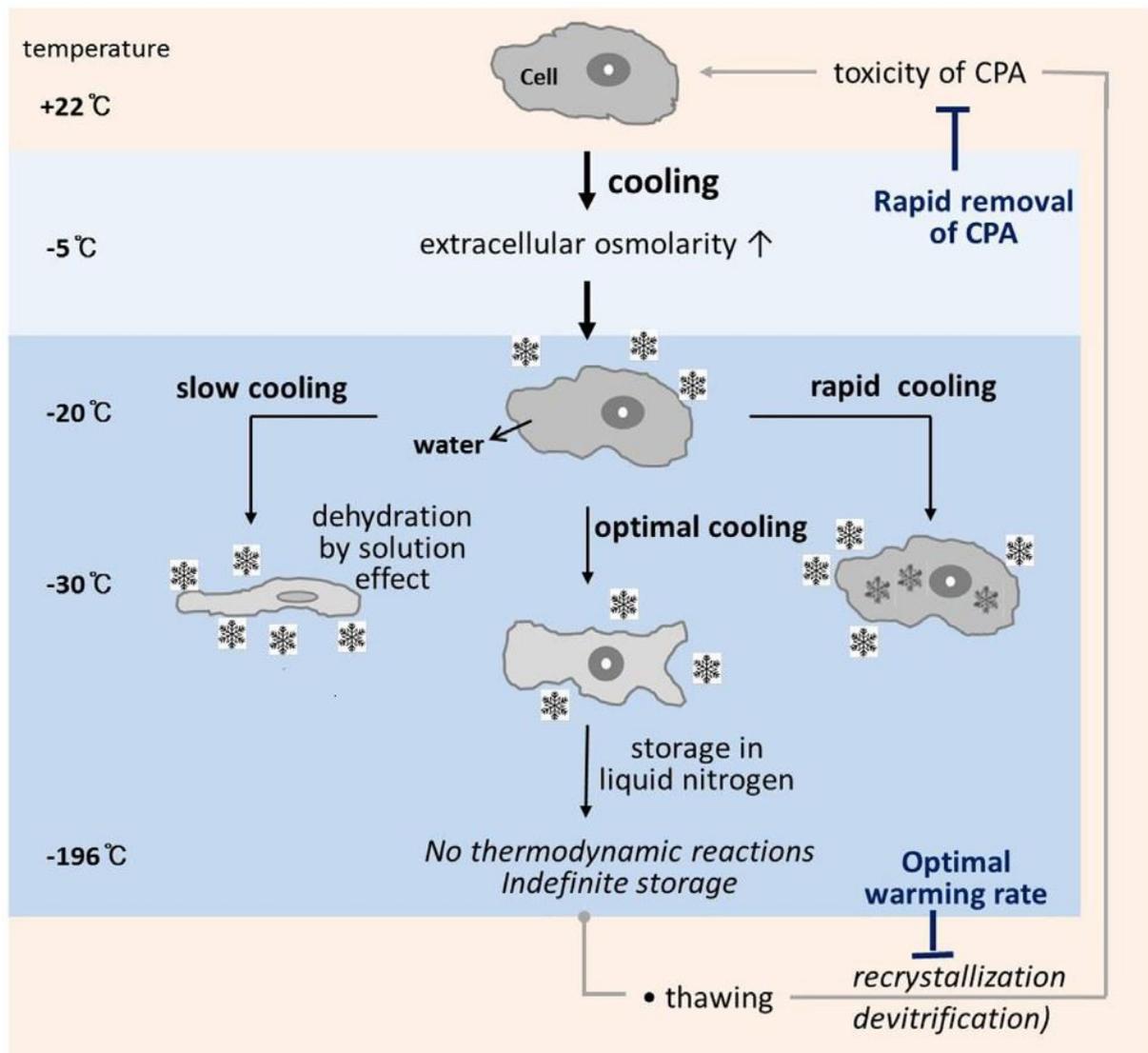


Figure 5 : vitesse de refroidissement et lésions cellulaires
 Source : Jang *et al*, 2017 (54)

Néanmoins, la vitesse de congélation n'est pas le seul paramètre à prendre en compte, car elle doit être adaptée à l'utilisation de composés essentiels à la cryopréservation : les agents cryoprotecteurs.

I.3.3. Les cryoprotecteurs

En raison de la formation de cristaux de glace passé le point de congélation, la recherche d'un abaissement de celui-ci, permettant de conserver les plus longtemps possible un refroidissement en phase liquide, a amené à l'introduction de solutés dans les milieux de congélation. Formalisé par Raoult en 1878 (55), l'abaissement du point de congélation en présence d'un soluté a amené les cryobiologistes à étudier les comportements des milieux de congélation en présence d'une augmentation croissante de solutés de nature variable : sels, sucres, alcools...

D'autre part, en raison de l'hyperosmolarité produite par la formation de cristaux de glace, ces molécules devaient pouvoir efficacement « tamponner » le choc osmotique et permettre une déshydratation cellulaire contrôlée. En 1948, Polge, Smith et Parkes tentaient de cryoconserver des spermatozoïdes de gallinacés à -70°C à l'aide d'un sucre, le lévulose. Ce serait par inadvertance qu'ils auraient remplacé celui-ci par une solution contenant du glycérol et de l'albumine : ce fut le premier cas décrit de survie cellulaire après congélation et la découverte des propriétés cryoprotectrices du glycérol qui lancèrent par la suite l'ère de la congélation et de la vitrification (55).

En 1969, Karow définissait les agents cryoprotecteurs (CPA) comme tout soluté dont l'addition dans un milieu de cryopréservation entraîne une amélioration des taux de survie après réchauffement (56).

En pratique, les cryoprotecteurs sont des solutés dont la présence va s'opposer à la formation de glace et prévenir la toxicité induite par celle-ci en équilibrant les phénomènes osmotiques. Leurs modes d'actions sont multiples et complexes et vont jouer à plusieurs niveaux.

L'une des premières propriétés, postulée par Nash (57), est la capacité d'établir des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Cette eau « liée » est une eau non osmotiquement efficace et indisponible pour la formation de cristaux de glace. De fait, les CPA augmentent la viscosité de la solution en ralentissant et perturbant le mouvement des molécules d'eau qui sont donc moins disponibles pour contribuer à la croissance des cristaux. En conséquence, les cryoprotecteurs vont diminuer la formation de cristaux par abaissement du point de congélation et augmentation de la viscosité. Ils vont également tamponner l'osmolarité extracellulaire.

L'autre propriété extensivement recherchée est l'interaction propre des cryoprotecteurs avec les membranes cellulaires. Celles-ci ont été mises en évidence comme cible privilégiée des lésions dues à la congélation et plusieurs auteurs ont modélisé des phénomènes de protection membranaire liés aux cryoprotecteurs (57,58).

Par ailleurs, les CPA semblent posséder des propriétés intrinsèques d'interaction avec les composants intracellulaires. Ces propriétés sont toujours étudiées aujourd'hui (57,59).

Enfin, Karow, dans ses travaux sur la pharmacologie des cryoprotecteurs, a défini deux classes majeures de molécules (56) :

- Les CPA de bas poids moléculaire ou agents pénétrants : ces molécules vont diffuser à l'intérieur des cellules préalablement déshydratées par exposition à un milieu hypertonique. Les CPA vont pénétrer à l'intérieur de la cellule et « remplacer » une partie de celle-ci. Ceci permet le contrôle de la déshydratation et le maintien de l'équilibre osmotique avec limitation de la formation de cristaux intracellulaires (58). En fonction de la molécule, des interactions spécifiques sont décrites avec les organelles et le cytosquelette des cellules congelées. Les CPA pénétrants les plus utilisés sont le diméthyl-sulfoxyde (DMSO), l'éthylène glycol (EG), le propylène glycol ou propanediol (PROH, PG) et le glycérol (7).
- Les CPA non pénétrants jouent quant à eux un rôle essentiel de prévention de la cristallisation extracellulaire par augmentation de l'osmolarité de la solution. Ils facilitent la vitrification en augmentant la viscosité du milieu et jouent enfin un rôle de tampon

osmotique. En effet, lors de l'étape du réchauffement, la sortie des CPAs et l'entrée d'eau dans la cellule peuvent entraîner un stress osmotique car l'eau pénètre plus rapidement la membrane plasmique que les cryoprotecteurs. Dans les protocoles de congélation lente, la fonte des cristaux de glace peut amplifier ce phénomène en libérant de l'eau osmotiquement active à proximité de la cellule et entraîner une dilution localisée du milieu (7,58). L'adjonction de bains successifs de CPA non pénétrants permet la désescalade contrôlée en retenant l'eau pour prévenir ce stress (58). Les CPA non pénétrants présentent également des propriétés de stabilisation de la membrane cellulaire externe. Il s'agit le plus souvent de sucres (sucrose, tréhalose), polysaccharides (Ficoll) ou polymères (7).

En raison des capacités d'interaction propres des cryoprotecteurs avec les membranes, organelles, enzymes et molécules intra- et extracellulaires, des phénomènes de toxicité ont été également décrits pour chaque molécule, à différents niveaux de l'activité cellulaire (60–62) rajouter principes of cryopreservation by vitrification. Ceci a conduit les biologistes à chercher à diminuer la durée d'exposition ainsi que les concentrations employées, notamment en associant les CPA. Aujourd'hui, la majorité des kits employés reposent sur des associations de CPA.

Le développement des agents cryoprotecteurs et la maîtrise de la vitesse de congélation ont abouti au développement des deux grandes techniques employées de nos jours : congélation lente et vitrification.

I.3.4. Congélation lente et vitrification

I.3.4.1. La congélation lente

En regard de la double hypothèse de Mazur et de la nécessité d'employer une vitesse de refroidissement optimale, la première stratégie de congélation employée en cryobiologie de routine fut la descente en température contrôlée ou congélation lente (7).

Cette descente progressive en température permet de prévenir la formation de glace intracellulaire en assurant une déshydratation optimale de la cellule. Néanmoins, la formation de glace extracellulaire va provoquer une augmentation progressive de l'osmolarité et potentiellement des dommages mécaniques directs. La congélation lente consiste donc à contrôler cette formation de cristaux pour prévenir ces lésions.

Pour cela, les protocoles de congélation lente s'appuient sur le principe de la surfusion : une solution liquide portée en dessous de son point de congélation, mais qui n'est pas encore solidifiée est dite dans un état « métastable ». Cela signifie que la réaction de cristallisation ne se produit pas immédiatement de façon spontanée, mais elle peut néanmoins être précipitée par un facteur extérieur (par exemple un choc mécanique) (57). Cette technique, appelée « seeding », est appliquée à un temps précis et à distance de la cellule afin de la protéger de la croissance du cristal, mais également de la réaction exothermique induite par la cristallisation. Parallèlement, on observe une pénétration progressive des CPA en réponse aux modifications progressives de l'osmolarité et de la température. Ceci garantit une bonne équilibration osmotique intracellulaire. Une fois cette équilibration réalisée, la solution est rapidement refroidie jusqu'à la température de l'azote liquide (figure 6). Ainsi, la congélation lente repose sur une stratégie de contrôle de la cristallisation et l'emploi de cryoprotecteurs à basse concentration.

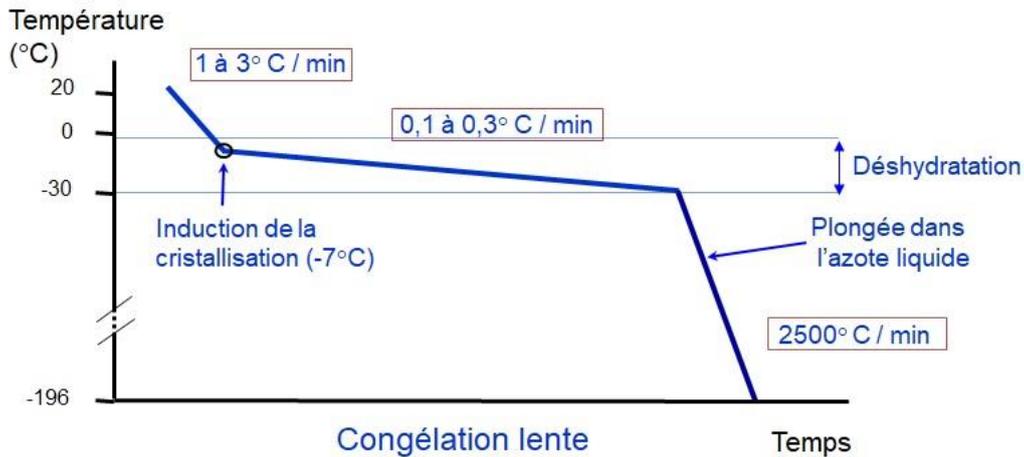


Figure 6 : exemple de protocole de congélation lente
Source : J. Mandelbaum-Bleibtreu (modifié) (63)

I.3.4.2. La vitrification

La vitrification repose sur une stratégie opposée à celle de la congélation lente : l'objectif est d'éviter complètement la formation de cristaux de glace. Comme nous l'avons vu, la glace est une structure organisée ou cristal. Par opposition, la vitrification aboutit à la formation d'un verre, au sens de solide amorphe, c'est-à-dire de structure non organisée.

Pour ce faire, la vitrification nécessite de « prendre de vitesse » le réarrangement des molécules d'eau en glace et atteindre le point de vitrification (« glass transition ») de la solution. Cette zone de transition est retrouvée pour de basses températures, dans des solutions de concentration élevée (57).

La probabilité de vitrification d'une solution repose sur trois facteurs (7):

- Une vitesse de refroidissement brutale (- 2 000 à -20 000 degrés par minute) (figure 7) limitant le temps disponible pour la réorganisation moléculaire, obtenue par contact direct avec l'azote liquide.
- L'augmentation de la viscosité du milieu, s'opposant également aux mouvements moléculaires. Ceci impose l'emploi de concentrations élevées de CPA.
- L'emploi d'un volume minimal de solution (facilitant les échanges thermiques).



Figure 7 : comparaison des méthodes de cryopréservation.
Source : J. Mandelbaum-Bleibtreu (modifié) (63)

La figure 8 propose une application d'un protocole de vitrification classique. Dans la figure, la zone de surfusion (entre T_m et T_h) indique un état où l'eau ne cristallise pas spontanément rapidement (état métastable). La zone en dessous de T_h (le point de nucléation homogène) correspond à un état instable, où l'eau cristallise spontanément et rapidement. Le protocole de vitrification implique donc d'élever progressivement la concentration de la solution à température ambiante, puis de la plonger dans l'azote liquide pour permettre la transition vitreuse en évitant la zone critique de nucléation homogène et donc la formation de cristaux de glace (7,57).

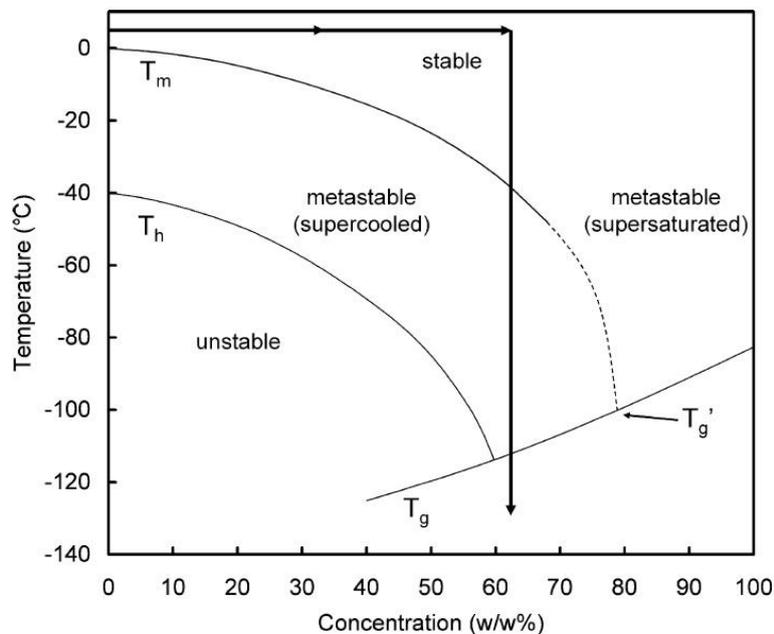


Figure 8 : exemple de protocole de vitrification d'une solution de glycérol et d'eau. T_m = point de fusion, T_h = point de nucléation homogène, T_g = transition vitreuse. Source : Wowk et al (57)

En pratique, le protocole classique de vitrification comporte une première phase d'exposition de l'ovocyte à des bains de concentrations progressives de cryoprotecteurs, à température adaptée au cryoprotecteur utilisé, afin de permettre la déshydratation intracellulaire par pénétration du CPA. Une fois l'équilibration terminée, la cellule est déposée sur un support de vitrification puis plongée directement dans l'azote liquide. Les cellules sont à ce moment déshydratées et « figées » dans une matrice amorphe. L'absence de formation de cristaux de glace intracellulaires garantit une préservation des organelles et des membranes et l'absence de cristallisation extracellulaire prévient l'accumulation toxique de solutés autour de la cellule.

I.3.5. Les supports de vitrification

L'emploi d'un volume de solution minimal est déterminant pour la réussite du processus de vitrification. En effet, la diminution du volume accélère les échanges thermiques et contribue directement à l'augmentation de la vitesse de refroidissement (7). De fait, un facteur technique entre en ligne de compte dans le parcours de vitrification : le choix du support.

En 1990, la première naissance sur embryon vitrifié fut obtenue à partir d'un protocole de conservation en paillettes de 250 microlitres, bien que le volume exact de la solution montée dans la paillette n'ait pas été détaillé (49). Six ans plus tard, des ovocytes de bovins étaient efficacement conservés par vitrification avec l'emploi pour support de grilles de microscopie électronique. Le volume était alors inférieur au microlitre (7,64). Rapidement, ces systèmes furent remplacés par les systèmes modernes de stockage et la première naissance à partir d'ovocyte virtrifié fut obtenue à l'aide du système Open Pulled Straw (OPS) qui consiste en une paillette dont l'embout extrêmement fin permet la conservation de gouttes de 1 à 2 microlitres (9). En 2005, Kuwayama décrivait le système Cryotop (65), dont la mise sur le marché a lancé l'ère de la vitrification de routine, avec un large nombre d'études menées à partir de ce support et du protocole associé (66,67).

Ainsi, de nos jours, trois types de supports sont retrouvés dans les protocoles de vitrification de routine (7) :

- Les paillettes de stockage creuses, dont le système Cryotip (dérivé du système OPS) (65,68).
- Les paillettes de stockage planes, dont les systèmes Cryotop et Cryolock, où la goutte est déposée sur une surface extrêmement fine (69).
- Les paillettes de stockage sur anneau de nylon (système Cryoloop) (70).

La figure 9 présente ces différents types de supports.

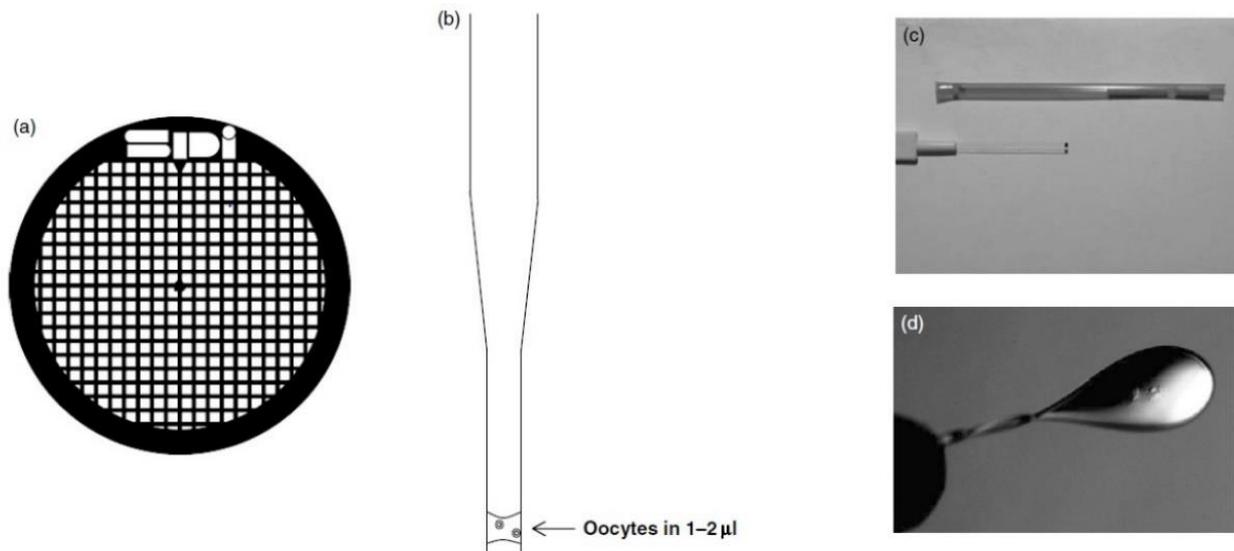


Figure 9 : différents systèmes de support : a) grille de microscopie électronique, b) système OPS, c) Cryotop et d) Cryoloop. Source : Patrick Quinn (7)

Par la suite, en raison du risque théorique de contamination des prélèvements par l'azote liquide, ces systèmes furent déclinés en versions dites « ouverte » ou « fermée » (figures 10 et 11).

Les systèmes ouverts se distinguent par un contact direct de la goutte de milieu avec l'azote liquide lors de la plongée. Ceci garantit une vitesse de de congélation maximale (-20 000 degrés par minute (71)), mais expose au risque de contamination du prélèvement par de l'azote liquide.

A l'opposé, les systèmes fermés sont constitués d'une gaine ou fourreau et de la paille support. Le fourreau est préalablement maintenu au contact de l'azote liquide pendant le processus d'équilibration de l'ovocyte. Ce dernier est ensuite placé sur le support et le support est à son tour inséré dans le fourreau. Le système est alors scellé, ce qui empêche tout contact direct du prélèvement avec l'azote liquide. En revanche, la présence d'une interface entre la goutte et l'azote liquide entraîne une diminution de la vitesse de congélation (de l'ordre de - 2 000 degrés par minute) (71).

Bien que le risque de contamination croisée n'est à ce jour que théorique (aucun cas de contamination croisée par stockage dans l'azote liquide n'a pour l'instant été rapporté) (38,72), le risque de contamination bactérienne ou fongique d'un prélèvement par une cuve souillée a quant à lui été démontré (73). Les recommandations européennes sur l'obtention et le contrôle des tissus d'origine humaine recommandent l'emploi de techniques garantissant l'asepsie (74) En dehors de cette recommandation, il n'existe pas de cadre légal strict interdisant l'emploi des systèmes ouverts et leur utilisation reste largement répandue en raison de la supériorité des vitesses de refroidissement et de réchauffement. L'impact réel de cette différence sur les résultats est encore sujet à débat dans la littérature (75).

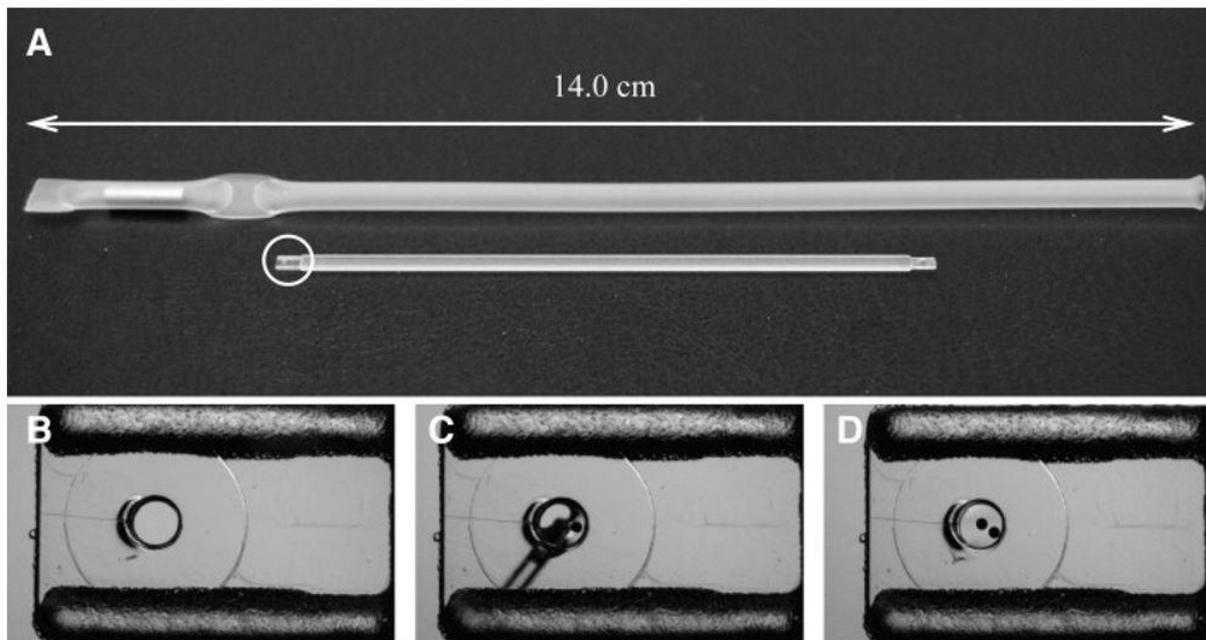


Figure 10 : système fermé Rapid-i™, Vitrolife

A : le fourreau (en haut) et le dispositif-support (en bas). La zone de dépôt du dispositif-support est mise en évidence par le cercle blanc.

B, C, D : dépôt de deux embryons sous contrôle microscopique au sein de la zone de dépôt.

Source : Larman et Gardner (76)

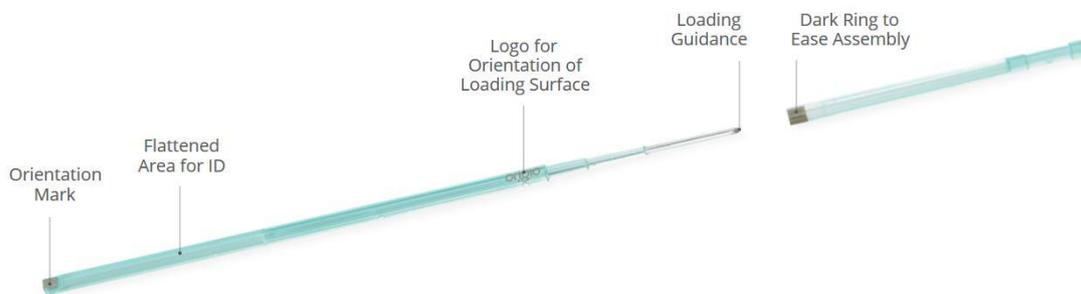


Figure 11 : système ouvert VitriFit™, CooperSurgical®

Source : CooperSurgical® (77)

I.3.6. Le réchauffement

Lors du réchauffement, le support de vitrification est extrait de l'azote liquide et immédiatement déposé dans une solution de réchauffement constituée d'un CPA non pénétrant à haute concentration. La cellule est ensuite exposée à des bains de concentration décroissante, afin de contrôler la réhydratation de la cellule et de limiter le choc osmotique (7).

Le CPA employé est habituellement un sucre, le plus souvent le sucrose. Récemment, certains fournisseurs ont remplacé le sucrose par le tréhalose (78,79).

Le réchauffement est aujourd'hui considéré par de nombreux auteurs comme la partie la plus critique du processus de cryopréservation (7,80,81), car le réchauffement est une situation plus à risque de cristallisation que la descente en température.

Cela s'explique par le fait que la nucléation initiale des cristaux de glace a lieu pour des températures inférieures aux températures favorables à la croissance des cristaux. En effet, cette croissance nécessite une certaine quantité de mouvement moléculaire pour permettre aux molécules de venir se greffer sur les points de nucléation. Néanmoins, une telle quantité de mouvement rend ces points de nucléations instables et ceux-ci ont donc tendance à apparaître pour des températures plus basses.

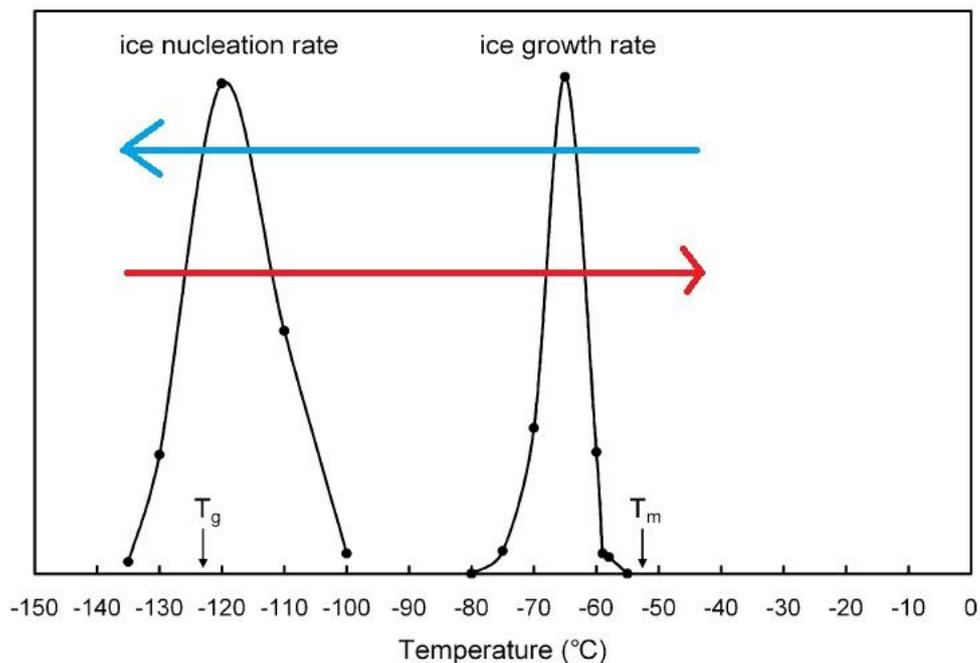


Figure 12 : nucléation et croissance. La flèche bleue indique la descente en température et la flèche rouge indique le réchauffement. Source : Wowk et al (modifié) (57)

La figure 12 illustre ce phénomène : la flèche bleue montre que, lors de la descente en température, la nucléation survient après la transition de la solution dans la zone critique de croissance des cristaux. A l'inverse, au moment du réchauffement (flèche rouge), la nucléation précède la croissance des cristaux et le risque de lésion cellulaire par « recristallisation » est donc maximal.

I.3.7. Comparaison des protocoles

Depuis la première naissance sur ovocyte vitrifié, de nombreux articles ont décrit des cohortes avec naissances d'enfants en bonne santé, principalement dans des programmes de don et la vitrification est devenue une technique accessible, considérée comme sûre (82) et donc employée en routine.

Toutefois, il existe encore une hétérogénéité entre les protocoles employés à travers le monde. Les différences varient entre la composition de la solution de base, la nature et la concentration

des cryoprotecteurs utilisés, la méthode d'équilibration, la nature du support utilisé et le type cellulaire concerné.

En effet, la cryopréservation en AMP peut concerner différents types de cellules : les spermatozoïdes, les ovocytes, les embryons à différents stades (zygote, stade clivé, stade de blastocyste) (66). En raison de la mauvaise résistance de l'ovocyte à la congélation lente et de la faible proportion du recours à la culture prolongée dans les années 1990, les principaux milieux de cryoprotection employés concernaient principalement le zygote et l'embryon clivé en congélation lente (6).

Vers la fin des années 1990, l'optimisation des protocoles de vitrification, le développement du support OPS et l'essor de la culture prolongée ont entraîné l'émergence de protocoles de vitrification dédiés aux blastocystes (ainsi qu'aux autres stades de développement embryonnaire) au début des années 2000 (6). Cinq ans plus tard, le développement du protocole Cryotop appliqué à l'ovocyte démocratisait quant à lui la vitrification ovocytaire (6). Le marché s'étoffait alors de milieux spécifiques à la vitrification ovocytaire ou embryonnaire.

L'application de ces milieux à différents types cellulaires a par la suite permis, moyennant l'adaptation des protocoles d'exposition, le développement de milieux de vitrifications dits « universels », permettant la cryopréservation à la fois des ovocytes et des embryons (80). Ces kits sont intéressants car ils permettent l'homogénéisation du matériel employé (milieux, supports) et donc l'optimisation de la gestion des stocks dans un laboratoire en AMP. Ils permettent également en théorie une meilleure maîtrise de la procédure qui est similaire entre la vitrification ovocytaire et embryonnaire. Aujourd'hui, la plupart des fournisseurs proposent un kit de milieux universels, comme le montre le tableau 1.

Les principaux milieux de vitrification employés sur le marché emploient une association de deux CPA pénétrants : éthylène glycol (EG) et diméthylsulfoxyde (DMSO) ou propanediol (PROH), additionnés d'un cryoprotecteur non pénétrant (sucrose, tréhalose ou Ficoll) (78,79,83,84). La combinaison de ces CPA permet de diminuer la part relative de la toxicité individuelle spécifique de chacun d'entre eux. L'éthylène glycol est majoritairement employé en raison d'une bonne pénétrance intracellulaire et d'une faible toxicité rapportée. En association, le DMSO est employé dans les milieux dérivés du protocole Cryotop. Néanmoins, en raison d'effets toxiques rapportés dans la littérature, des milieux « DMSO-free » ont été commercialisés. Ces derniers emploient majoritairement le propanediol en substitution.

Par ailleurs les concentrations en CPA ne sont pas toujours fournies par le fournisseur, de même que la présence éventuelle d'autres éléments tels que le calcium, des protéines « anti-gel » ou des protéines évoquées comme « neutralisantes » de la toxicité spécifique des CPA.

Les protocoles d'exposition aux solutions de cryoprotection varient dans le nombre et la concentration des bains successifs, les temps de contact et les modalités de passage d'un bain à l'autre. Pour un même milieu, ces modalités peuvent varier entre différents types cellulaires.

Fournisseur	Nom du milieu	Cryoprotecteurs employés	Types cellulaires concernés
Vitrolife	RapidVit™ Oocyte	EG – PROH Sucrose	Ovocyte
Vitrolife	RapidVit™ Cleave	EG – PROH Ficoll – Sucrose	Embryon clivé
Vitrolife	RapidVit™ Blast	EG – PROH Ficoll	Blastocyste
Vitrolife	RapidVit™ Omni	EG – PROH Sucrose	Ovocyte – embryon clivé – blastocyste
Kitazato®	VT601 Kitazato Vitrification Solution	EG – DMSO Tréhalose	Ovocyte – zygote – embryon clivé – blastocyste
Fujifilm - Irvine Scientifics	Vit Kit-NX	EG – DMSO Tréhalose	Ovocyte – zygote – embryon clivé – blastocyste
Cryothech®	Cryotech® Vitrification Kit 101	EG – DMSO Tréhalose	Ovocyte – embryon clivé – blastocyste
Cooper Surgical®	SAGE™ Vitrification Kit	EG – DMSO Sucrose	Ovocyte (US seulement) – zygote – embryon clivé – blastocyste
Cooper Surgical®	MediCult Vitrification Cooling	EG – PROH Sucrose	Ovocyte – embryon clivé – blastocyste (EU) Embryon clivé (US)

Tableau 1 : principaux milieux de vitrification disponibles sur le marché.
EG : éthylène glycol, DMSO : dyméthylsulfoxyde, PROH : propanediol.

Le tableau 2 présente les différents milieux, protocoles, supports et résultats retrouvés dans la littérature.

Année	Auteur	Milieu de vitrification	Milieu de réchauffement	Système
2008	Cobo et al. (67)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2009	Chian et al. (85)	EG + PROH 7,5% // EG + PROH 15% + sucrose 0,5	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M // Sucrose 0.25M	Cryoleaf (ouvert)
2009	Cao et al. (86)	EG + PROH 7,5% // EG + PROH 15% + sucrose 0,5	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M // Sucrose 0.25M	Cryoleaf (ouvert)
2010	Rienzi et al. (82)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2010	Smith et al. (41)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	CryoTip (fermé)
2010	Cobo et al. (87)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2011	Paffoni et al. (88)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	CryoTip (fermé)
2011	Paffoni et al. (88)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2011	Parmegiani et al. (89)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2011	Trokoudes et al. (39)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2012	Stoop et al. (81)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	CBS haute sécurité (fermé)
2012	Rienzi et al. (90)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2012	Cai et al. (91)	EG + PROH 7,5% // EG + PROH 15% + sucrose 0,5	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M // Sucrose 0.25M	JY straws (ouvert)
2013	Machac et al. (92)	EG + PROH + sucrose (RapidVit™ Oocyte)	Sucrose (RapidWarm™ Oocyte)	Rapid-i (fermé)
2015	Cobo et al. (93)	EG + DMSO 15% // EG + DMSO 30%	Tréhalose	Cryotop (ouvert)
2016	De Munck et al. (94)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	CBSvit (fermé)
2016	De Munck et al. (95)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2016	De Munck et al. (95)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	CBSvit (fermé)
2016	Papatheodorou et al. (96)	DMSO + EG 1,25 % - 2,5 % - 5 % - 10 % // DMSO 20% EG 20% + sucrose + Ficoll	Sucrose 1M // Sucrose 0,75M // Sucrose 0,5M // Sucrose 0.25M	Vitrisafe (fermé)
2016	Braga et al. (97)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2017	Cobo et al. (98)	EG + DMSO 15% // EG + DMSO 30%	Tréhalose 1M // tréhalose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2018	Seshadri et al. (99)	DMSO + EG (Kitazato Vitrification Solution)	Tréhalose (Kitazato Warming Solution)	Cryolock (ouvert)
2019	Pujol et al. (100)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2019	Pujol et al. (100)	EG + PROH + sucrose (RapidVit™ Oocyte)	Sucrose (RapidWarm™ Oocyte)	Rapid-i (fermé)
2020	Rienzi et al. (101)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)
2020	Gala et al. (102)	EG + DMSO 7,5% // EG + DMSO 15% + 0,5 sucrose	Sucrose 1M // Sucrose 0,5M	Cryotop (ouvert)

Tableau 2 : Revue des milieux et supports utilisés pour la vitrification des ovocytes. Les études surlignées en orange utilisent le diméthylsulfoxyde comme cryoprotecteur (DMSO), les études surlignées en bleu utilisent le propanediol (PROH). Les supports de vitrification utilisés surlignés en vert sont des supports ouverts, les supports surlignés en jaune sont des supports fermés.



Ce tableau souligne l'emploi en majorité du DMSO dans la littérature, dans des protocoles dérivés de la formulation proposée par Kuwayama (103). Les données rapportées concernent principalement des populations de donneuses jeunes. De très bons résultats sont retrouvés en termes de taux de survie, de taux de fécondation et d'issues obstétricales pour les différents types de protocoles et de supports et il n'existe pour l'instant pas de milieu « de référence » dont l'emploi serait recommandé par rapport aux autres.

Au laboratoire d'AMP-CECOS du CHU de Clermont-Ferrand, la vitrification a d'abord été appliquée à l'embryon en 2011 et les milieux spécifiques RapidVit™ Cleave et Blast ont été employés pour la vitrification des embryons respectivement au stade clivé et blastocyste. Le choix de ces milieux reposait sur l'absence de DMSO dans leur composition et l'utilisation d'un support fermé adapté aux pratiques du laboratoire. Lorsque la courbe d'apprentissage a été satisfaisante pour la vitrification embryonnaire pour l'ensemble des techniciennes du laboratoire d'AMP, la vitrification ovocytaire a ensuite été mise en place pour la constitution d'une banque d'ovocytes donnés à partir de 2013.

En l'absence de milieu spécifique ovocytaire ou universel « DMSO-free » chez le fournisseur (Vitrolife), celui-ci a proposé l'utilisation pour la vitrification ovocytaire d'une combinaison d'un milieu de vitrification spécifique de l'embryon au stade blastocyste (RapidVit™ Blast) et d'un milieu de réchauffement spécifique de l'embryon au stade clivé (RapidWarm™ Cleave). Nous avons donc d'abord employé cette combinaison de milieux pour la vitrification ovocytaire à partir de janvier 2013. Le fournisseur a ensuite développé un milieu spécifique ovocytaire (RapidVit™ / RapidWarm™ Oocyte, Vitrolife) qui a été appliqué au laboratoire AMP-CECOS du CHU de Clermont Ferrand à partir de juillet 2015. Enfin, le fournisseur a développé un milieu universel (applicable pour la vitrification de l'ovocyte et de l'embryon (RapidVit™ / RapidWarm™ Omni, Vitrolife) appliqué depuis février 2018 pour la vitrification et réchauffement des ovocytes donnés. L'emploi de ce milieu universel a cependant donné de moins bons résultats que les milieux spécifiques embryonnaires pour la vitrification des embryons dans notre centre, ce qui a abouti à l'arrêt de son utilisation.

De fait, sur une période de sept ans, trois types de milieux de vitrification/réchauffement ont été appliqués en don d'ovocyte : des milieux spécifiques à l'embryon, des milieux spécifiques à l'ovocyte et des milieux dit universels.

L'objectif de notre travail est d'analyser les résultats en taux de grossesse en AMP avec don d'ovocytes dans le service AMP-CECOS du CHU de Clermont-Ferrand sur la période du 30/01/2014 au 02/07/2020 après utilisation successive de trois types de milieux de vitrification/réchauffement (embryon, ovocyte et universel) afin d'évaluer l'impact potentiel de l'utilisation des différents milieux et notamment des milieux universels.



II. Objectifs et méthodes

II.1. Population étudiée et plan expérimental

Cette étude analyse les résultats des tentatives d'ICSI avec don d'ovocytes pour les 106 couples receveurs pris en charge dans le service d'AMP-CECOS du CHU de Clermont-Ferrand entre le 30/01/2014 et le 02/07/2020.

Pour ces tentatives les ovocytes issus de don ont tous été vitrifiés (108 donneuses, 110 dons). Quatre milieux de vitrification et/ou réchauffement ont été utilisés de façon successive sur cette période, auxquels ont été attribué une lettre (A, B, C ou D) pour des raisons de simplification (tableau 3) :

Lettre d'attribution	Milieu de vitrification	Période d'emploi	Milieu de réchauffement	Période d'emploi
A	RapidVit™ Blast , Vitrolife	02/2013 – 05/2015	-	-
B	RapidVit™ Oocyte , Vitrolife	07/2015 – 01/2018	RapidWarm™ Oocyte , Vitrolife	03/2016 – 01/2018
C	RapidVit™ Omni, Vitrolife	02/2018 – 01/2020	RapidWarm™ Omni , Vitrolife	02/2018 – 01/2020
D	-	-	RapidWarm™ Cleave , Vitrolife	01/2014 – 09/2017

Tableau 3 : milieux de vitrification employés

Les combinaisons suivantes de milieu de vitrification et de réchauffement ont été appliquées successivement sur la période d'étude de janvier 2014 à juillet 2020 :

- Protocole **AD** : RapidVit™ Blast et RapidWarm™ Cleave (milieux embryonnaires)
- Protocole **BB** : RapidVit™ Oocyte et RapidWarm™ Oocyte (milieux ovocytaires)
- Protocole **BC** : RapidVit™ Oocyte et RapidWarm™ Omni (vitrification ovocyttaire + réchauffement universel)
- Protocole **CC** : RapidVit™ Omni et RapidWarm™ Omni (milieux universels)

Au total, 106 couples receveurs ont été pris en charge sur cette période. Les étiologies de recours au don des couples receveurs ont été répertoriées de la façon suivante : insuffisance ovarienne prématurée, échec de fécondation intra-couple et risque de transmission d'une pathologie génétique.

Les critères d'inclusion des donneuses étaient (1) un âge de 18 à 37 ans, (2) un interrogatoire et un examen clinique ne contre-indiquant pas une prise en charge pour stimulation ovarienne, (3) une enquête génétique ne retrouvant pas d'argument pour une pathologie grave, (4) une

évaluation psychologique pour les donneuses n'ayant pas procréé (n=14), (5) un caryotype normal et (6) un bilan sérologique infectieux normal.

Le bilan sérologique infectieux des donneuses inclue la réalisation des sérologies VIH, VHB, VHC et syphilis, ainsi que l'établissement du statut sérologique vis-à-vis du CMV, de *Chlamydia trachomatis* et des virus HTLV-I et HTLV-II (15). Les résultats de ce bilan sérologique doit être normal dans le délais de trois mois avant le jour de la ponction ovocytaire. De plus, des charges virales pour le VIH, le VHB, le VHC et le CMV sont prélevées le jour de la ponction ovarienne.

Sur les 108 donneuses, 94 avaient déjà procréé et étaient mères d'un enfant en bonne santé. Neuf d'entre elles ont accompli leur don au cours d'un protocole d'egg-sharing. Parmi les 14 donneuses n'ayant pas procréé, 6 femmes ont souhaité bénéficier d'une autoconservation.

Toutes les donneuses ont signé un consentement éclairé pour ce don et les couples receveurs ont signé un consentement pour prise en charge en AMP avec don de gamètes conformément à la réglementation française (15).

Les couples receveurs ont été pris en charge en ICSI. Après l'injection par ICSI des ovocytes réchauffés, le transfert intra-utérin d'un ou deux embryons était réalisé au deuxième jour de développement (stade clivé) ou au cinquième jour de développement (stade blastocyste). De 2013 à 2016, les transferts embryonnaires ont été essentiellement réalisés au stade clivé. La maîtrise progressive de la culture prolongée et de la vitrification au stade blastocyste a par la suite permis de réaliser plus fréquemment un transfert au stade blastocyste, de 2016 à 2020.

Neuf à dix jours après le transfert, les patientes ont bénéficié d'un dosage sanguin des beta-HCG. En cas de résultat positif, un dosage de confirmation était réalisé à 48h, afin d'apprécier la cinétique d'évolution. Si ce taux doublait, une échographie de datation était prévue entre 7 et 8 semaines d'aménorrhée. La présence d'un sac gestationnel intra utérin comportant un embryon avec une activité cardiaque à l'échographie définissait alors la grossesse clinique. Une persistance de ce sac à l'échographie du premier trimestre (11-12 SA) définissait la grossesse évolutive ou grossesse « en cours ».

De 2013 à 2017, la culture embryonnaire a été réalisée en milieux séquentiels (suite G1™-G2™, Vitrolife) à 37°C, 6% CO₂, 5% O₂. Depuis janvier 2018, la culture embryonnaire est réalisée en milieu unique (GTL-PLUS™, Vitrolife) à 37°C, 6% CO₂, 5% O₂.

Les embryons transférés au stade clivé étaient les embryons considérés comme « TOP », c'est-à-dire normalement fécondés, présentant quatre blastomères typiques et moins de 30% de fragmentation. Lorsque le transfert embryonnaire était réalisé à J5, le blastocyste choisi pour le transfert était au moins de stade B3 pour la classification de Gardner (32) et était caractérisé par une masse cellulaire interne et un trophoctoderme de grade A ou B.

II.2. Protocole de stimulation des donneuses

Deux protocoles de blocage de l'ovulation ont été utilisés :

- Le protocole agoniste, avec blocage ovulatoire induit par injection de triptoréline LP 3mg (DECAPEPTYL®) au premier jour du cycle précédent.
- Le protocole antagoniste, avec blocage ovulatoire induit par injection de cétrorelis (CETROTIDE®) ou ganirelix (FYREMADEL®) en dose journalière de 0,25mg à compter de l'obtention de follicules d'une taille égale à 14 mm en surveillance échographique.

La stimulation folliculaire a été réalisée par injections quotidiennes de FSH recombinante (Follitropine alpha GONAL-F®, BEMFOLA®; Follitropine beta PUREGON®) ou de ménotropines (MENOPUR®, FERTISTARTKIT®). La dose de départ était déterminée selon l'âge et le bilan de réserve ovarienne de la patiente, puis adaptée à la surveillance échographique à partir de J8-J10.

Le déclenchement de l'ovulation était réalisé à partir de l'obtention d'au moins quatre follicules de 17mm, par injection de choriogonadotrophine alpha (OVITRELLE® 250 UI) dans les deux types de protocole ou de triptoréline (DECAPEPTYL® 0,1mg, 2 ampoules) en cas de protocole antagoniste.

La ponction ovarienne pour recueil des complexes cumulo-ovocytaires par voie transvaginale a été réalisée 35 heures après le déclenchement de l'ovulation.

II.3. Préparation endométriale des patientes receveuses

La préparation endométriale des receveuses en cycle naturel était réalisée par administration d'œstradiol per os (OROMONE®) 2 mg matin et soir à partir de J2 du cycle de la receveuse, avec augmentation à trois comprimés à J8. Une surveillance échographique à partir de J13-J14 permet d'estimer l'épaisseur endométriale. A partir d'une épaisseur de 7-8mm, une supplémentation par progestatif intra-vaginal était instaurée (PROGESTAN® 200 mg, 3 ovules par jour). Le transfert était alors réalisé à J2 ou J5 de prise en fonction du stade embryonnaire. Le traitement était poursuivi jusqu'à la prise de sang de contrôle.

Pour les patientes faibles répondeuses, un cycle de stimulation artificielle monofolliculaire a été réalisé, avec injection de gonadotrophines à partir de J8, blocage de l'ovulation et déclenchement de l'ovulation (OVITRELLE ®) lorsque la maturité endométriale était satisfaisante.

II.4. Protocoles de vitrification et de réchauffement ovocytaire

Les ovocytes ont été décoronés (Hyaluronidase 80 UI/mL) deux heures après ponction ovarienne. Après évaluation de la maturité nucléaire, les ovocytes en métaphase de 2^e division de méiose ont été vitrifiés.

Chaque protocole de vitrification utilise des milieux tamponnés en MOPS, supplémentés par de la gentamycine et de l'albumine humaine (HSA). Les cryoprotecteurs contenus dans chacun des milieux sont rapportés dans le tableau 4. Les concentrations sont tenues confidentielles par le fournisseur.

Milieu	Blast (A)	Temps d'incubation	Oocyte (B)	Temps d'incubation	Omni ©	Temps d'incubation
Bain n°1	Aucun CPA	5 - 20 minutes	Aucun CPA	5 - 20 minutes	Aucun CPA	5 - 20 minutes
Bain n°2	Ethylène glycol Propanediol	2 minutes	Ethylène glycol Propanediol	2 – 5 minutes	Ethylène glycol Propanediol	2 – 5 minutes
Bain n°3	Ethylène Glycol Propanediol Ficoll	35 – 45 secondes	Ethylène Glycol Propanediol Sucrose	25 – 35 secondes	Ethylène Glycol Propanediol Sucrose	30 – 45 secondes

Tableau 4 : composition et conditions d'utilisation des milieux pour chaque protocole de vitrification ovocytaire utilisé. CPA : agent cryoprotecteur.

Le protocole de vitrification est présenté dans la figure 13. L'ensemble des manipulations est effectué à 37°C. Après une incubation de 5 à 20 minutes dans 1mL de milieu de base tamponné en MOPS sans cryoprotecteur (bain n°1), les ovocytes sont mis en équilibre dans 1 mL de milieu contenant de l'éthylène glycol et du propanediol (bain n°2). Cette équilibration dure deux minutes pour le protocole A. Pour les protocoles B et C, l'équilibration est objectivée par une rétraction puis réexpansion de l'ovocyte (figure 14), dans les deux à 5 minutes après l'immersion. Enfin, les ovocytes sont placés dans la solution de vitrification (bain n°3). Cette étape se déroule dans une gouttelette de 20 µL pour le protocole A, dans 2 gouttes successives de 50 µL pour le protocole B et dans une goutte de 20 µL pour le protocole C.

Les ovocytes sont ensuite disposés sur la zone de chargement du support Rapid-i® dans un minimum de milieu. La paille est ensuite immédiatement plongée dans son fourreau préalablement immergé dans l'azote liquide au sein d'une Smart-Box (Vitrolife). Le dispositif est ensuite scellé à l'aide d'une soudeuse à ultrasons.

Chaque paille contenant un seul ovocyte est au préalable identifiée par un numéro unique.

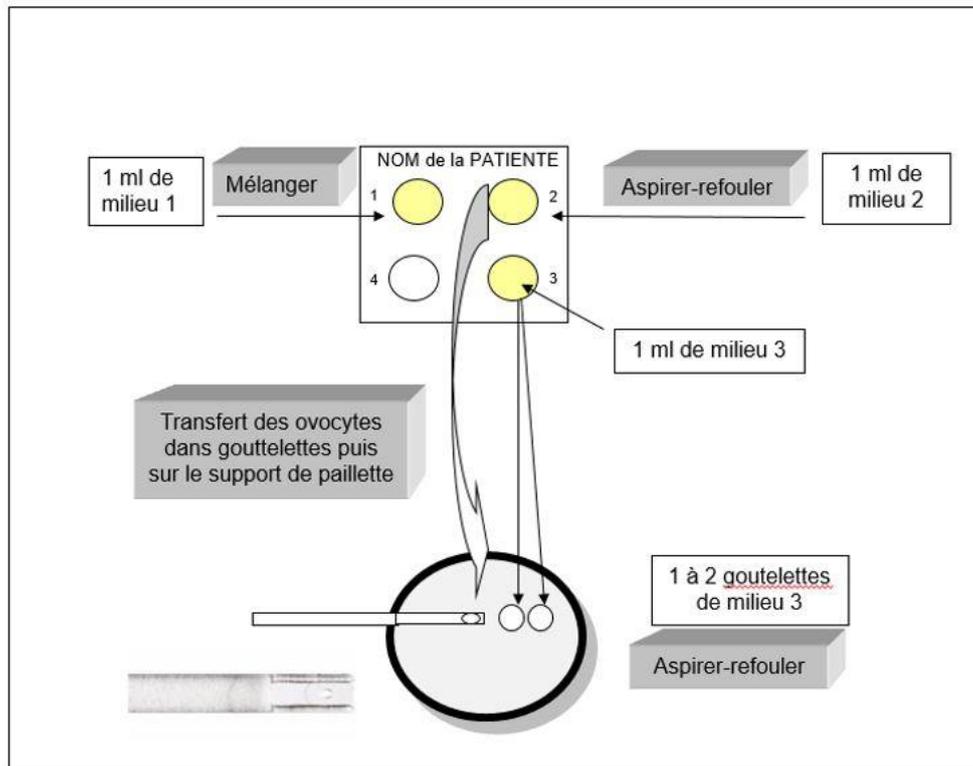


Figure 13 : protocole de vitrification

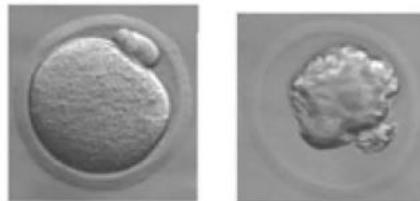


Figure 14 : ovocyte expansé (à gauche) et collapsé (à droite). Source : Smith et al. (43)

Les ovocytes sont ensuite stockés dans une cuve d'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

Pour le réchauffement des ovocytes vitrifiés, trois protocoles ont été employés successivement (tableau 5).

Milieu	Oocyte (B)	Temps d'incubation	Omni (C)	Temps d'incubation	Cleave (D)	Temps d'incubation
Bain n°1	Sucrose	1 min	Sucrose	1 min	Sucrose	10 – 30s
Bain n°2	Sucrose	3 min	Sucrose	3 min	Sucrose	1 min
Bain n°3	Sucrose	5 min	Sucrose	5 min	Sucrose	2 min

Tableau 5 : composition et temps d'incubation des bains de réchauffement.

Le protocole de réchauffement est présenté dans la figure 15. Pour les trois protocoles, les ovocytes réchauffés sont exposés successivement à des concentrations décroissantes de sucrose dans des bains de 1mL à 37°C. Les temps d'exposition sont présentés dans le tableau 5. Les ovocytes sont ensuite rincés dans des microgouttes de milieu de rinçage (GTL Plus™, Vitrolife), puis placés dans une microgoutte de milieu de culture embryonnaire. La survie embryonnaire est alors évaluée immédiatement, puis deux heures après. Les ovocytes intacts peuvent alors être injectés.

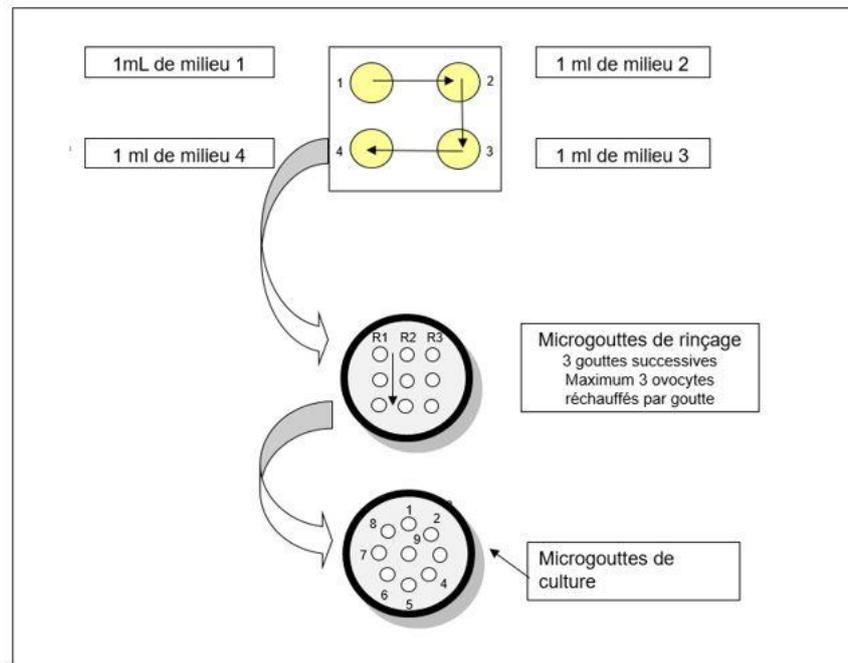


Figure 15 : protocole de réchauffement.

II.5. ICSI et culture embryonnaire

Après réchauffement, les ovocytes sont ensuite micro-injectés à l'aide d'un microscope avec système de micromanipulation. Pour chaque ovocyte intact, un spermatozoïde est sélectionné sur des critères de forme et de mobilité et est injecté au sein du cytoplasme. A l'issue de la

procédure, les ovocytes ainsi fécondés sont disposés dans des microgouttes de milieu de culture embryonnaire. Ils sont ensuite placés dans une étuve thermostatée.

Le développement embryonnaire est ensuite évalué par lecture au microscope ; les événements évalués sont la présence d'une fécondation correcte à J1, la présence d'un clivage précoce, la morphologie à J2, J3, J5 et J6. Les embryons sont typés à J2 et J5 pour décider d'un éventuel transfert ou d'une vitrification.

Plusieurs variables ont été évaluées en regard du développement embryonnaire :

- Le taux de fécondation, défini comme le rapport entre le nombre d'ovocytes correctement fécondés (zygotes) sur le nombre d'ovocytes injectés
- Le taux d'obtention J2, défini comme le rapport entre le nombre d'embryons J2 sur le nombre de zygotes
- Le taux de tops J2, défini comme le rapport entre le nombre de TOP J2 sur le nombre d'embryons J2
- Le taux de blastulation, défini comme le nombre d'embryon ayant au moins atteint le stade B1 à l'issue de la culture prolongée (CP) sur le nombre d'embryons ayant été mis en CP
- Et le taux de top J5, défini comme le nombre de blastocystes TOP sur le nombre de blastocystes obtenus

II.6. Transfert embryonnaire et issues de grossesse.

Le transfert embryonnaire a été le plus souvent réalisé à J2. Un ou deux embryons au maximum ont été transférés sur les premières tentatives. Le ou les embryons étaient transférés en intra-utérin sous contrôle échographique à l'aide d'un cathéter de transfert (Frydman® Classic ou TDT®, laboratoire CDD). La patiente receveuse a bénéficié d'un soutien de la phase lutéale par ovules de progestérone.

II.7. Critères de jugement

Le critère de jugement principal était le taux de grossesse cliniques par transfert embryonnaire, défini comme le nombre de grossesses cliniques rapportées au nombre de transferts embryonnaires effectués.

Les critères de jugement secondaires étaient :

- Le taux de survie ovocytaire, défini comme le nombre d'ovocytes injectés sur le nombre d'ovocytes réchauffés
- Les paramètres du développement embryonnaire précoce tels que décrits précédemment
- Le taux d'implantation, défini comme le nombre de sacs avec activité cardiaque rapporté au nombre d'embryons transférés
- Le taux d'implantation pour 100 ovocytes réchauffés, défini comme le nombre de sacs avec activité cardiaque dans le sous-groupe rapporté au nombre total d'ovocytes réchauffés
- Le taux d'accouchement et le taux de fausses couches par transfert

- Les taux de grossesse par cycles frais, cycles cumulés et cycles cumulés complet. Les taux de grossesses par cycles frais étaient définis comme le nombre de grossesses sur transfert frais sur le nombre de tentatives entamées dans le sous-groupe.
- Les taux de grossesses par cycles cumulés représentaient le nombre de grossesses sur transfert frais et transferts d'embryons décongelés, rapportés au nombre de tentatives dans le sous-groupe.
- Enfin, le taux de grossesses par cycles cumulés complet rapportait au nombre de grossesses sur transfert frais et transfert d'embryons décongelés rapportés au nombre de tentatives pour lesquelles le cycle était considéré comme complet. Un cycle complet était défini comme un cycle où l'ensemble des embryons transférables obtenus avaient été transférés ou tout cycle où au moins un accouchement avait eu lieu (104).

II.8. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata (version 15, StataCorp, College Station, US).

Les données catégorielles sont décrites par des effectifs et pourcentages, alors que les données quantitatives sont présentées, au regard de leur distribution statistique, en termes de moyenne et écart-type ou médiane et intervalle interquartile.

La normalité (distribution gaussienne) a été étudiée par le test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons entre groupes, selon les milieux de vitrification/réchauffement, ont considéré des modèles mixtes permettant de prendre en compte les différentes sources de variabilité, notamment « données répétées » en termes de donneuses d'ovocytes et de couples receveurs.

Des modèles linéaires (mixtes) ont été mis en œuvre pour les données (dépendantes) de nature quantitative et des modèles linéaires généralisés (mixtes) de type logistique pour les variables catégorielles.

Lorsque les analyses ne concernaient pas des données répétées telles que décrites précédemment, les comparaisons entre groupes ont été réalisées par le test du Chi² ou le cas échéant par le test exact de Fisher pour les paramètres de nature catégorielle et par ANOVA ou test de Kruskal-Wallis si les conditions d'application de l'ANOVA n'étaient pas respectées. L'homoscédasticité a été étudiée par le test de Bartlett.

Tous les tests statistiques ont été réalisés en formulation bilatérale pour un risque d'erreur de première espèce de 5% ; quand nécessaire (omnibus p-value inférieure à 0.05), une correction de type Sidak a été appliquée afin de prendre en compte les comparaisons multiples.

III. Résultats

III.1. Caractéristiques des couples receveurs et donneuses

Les caractéristiques des couples receveurs sont présentées dans le tableau 6.

Nous n'avons pas observé de différence significative concernant l'âge, l'indice de masse corporelle (IMC) le rang de tentative, l'épaisseur endométriale à J14 et les paramètres du spermogramme des couples receveurs pris en compte dans notre étude dans les 4 groupes analysés.

Il n'a pas été mis en évidence de différence pour les indications de recours au don d'ovocytes entre les différents groupes de receveurs analysés (figure 16).

Groupe	AD	BB	BC	CC	p-value
Nombre de tentatives	40	41	39	31	
Age (années)	35,8 ± 4,8	33,7 ± 4,7	36,4 ± 4,1	35,0 ± 4,3	ns
IMC (kg/m ²)	23,8 ± 3,7	23,9 ± 4,8	24,2 ± 4,8	23,8 ± 4,3	ns
Rang moyen de tentative ICSI	1,3	1,5	1,2	1,3	ns
Epaisseur endométriale à J14 (mm)	7,7 ± 2,2	8,1 ± 2,1	9,0 ± 2,1	8,5 ± 2,7	ns
Numération spermatozoïdes (10 ⁶)	196,8 ± 208,7	284,1 ± 225,7	187,7 ± 183,9	232,9 ± 205,6	ns
Concentration spermatozoïdes (10 ⁶ /mL)	65,6 ± 70,4	84,3 ± 66,6	79,0 ± 66,6	77,7 ± 66,5	ns
Mobilité progressive spermatozoïdes (%)	42,0 ± 12,9	45,1 ± 15,0	41,7 ± 13,2	40,6 ± 9,9	ns
Formes typiques spermatozoïdes (%)	7,8 ± 7,6	6,5 ± 7,6	5,4 ± 5,5	7,0 ± 4,8	ns

Tableau 6 : caractéristiques des couples receveurs.
Les résultats sont décrits en moyenne (+/- écart-type).
Le seuil de significativité est $p < 0,05$, ns = non significatif

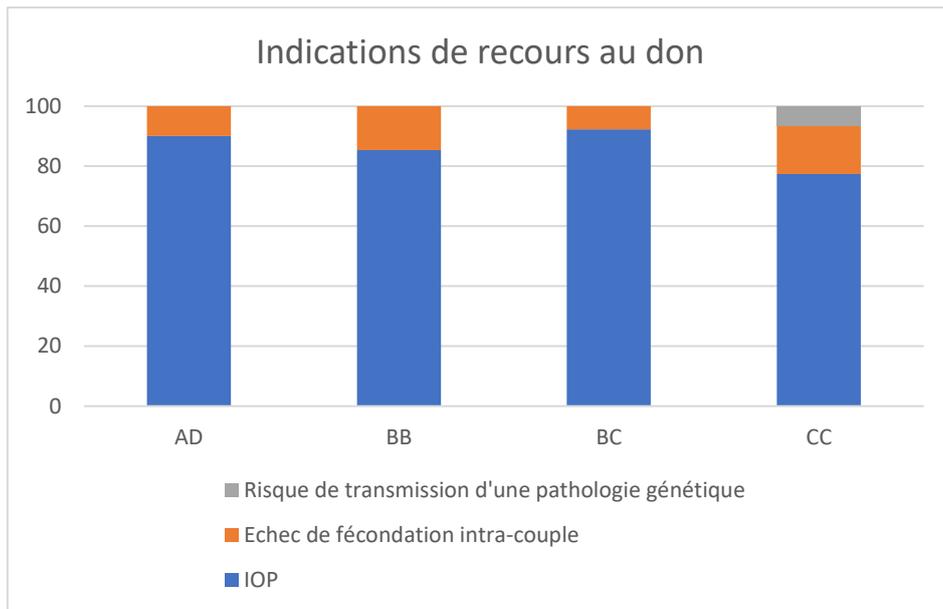


Figure 16 : Indications de recours au don d'ovocytes ($p=0,29$)

Les caractéristiques de la population des donneuses sont présentées dans le tableau 7.

Il n'est pas retrouvé de différence significative au niveau de l'âge moyen ou de l'IMC des donneuses. La proportion de donneuses sans enfant était plus faible au sein du groupe AD ($p = 0.009$).

A propos du protocole de stimulation, nous n'avons pas observé de différence en regard de la dose totale de gonadotrophines administrées, du nombre de CCOs ponctionnés et du nombre d'ovocytes vitrifiés. Nous avons observé une augmentation progressive du recours au protocole antagoniste dans le temps ($p = 0,001$) (figure 17).

Groupe	AD	BB	BC	CC	p-value
Age moyen (années)	31,6 ± 3,0	31,9 ± 3,7	31,6 ± 3,1	31,6 ± 4,0	ns
IMC (kg/m ²)	24,0 ± 3,8	22,9 ± 4,1	23,3 ± 4,6	23,3 ± 3,9	ns
Part des donneuses sans enfants (%)	0	5,1	18,4	19,3	0.009
Nb receveuses allouées	1,9 ± 0,7	2,1 ± 1,5	1,7 ± 1,0	1,3 ± 0,7	0,027
Dose totale de gonadotrophines (UI)	1803,4 ± 506,1	1882 ± 508,6	1731,5 ± 493,8	1827,0 ± 518,6	ns
Nombre de CCOs ponctionnés	15,6 ± 5,9	19,3 ± 12,5	16,5 ± 9,5	14,2 ± 6,6	ns
Nombre d'ovocytes vitrifiés	10,5 ± 3,9	13,1 ± 9,5	12 ± 7,4	10,5 ± 4,8	ns

Tableau 7 : données relatives à la population des donneuses.

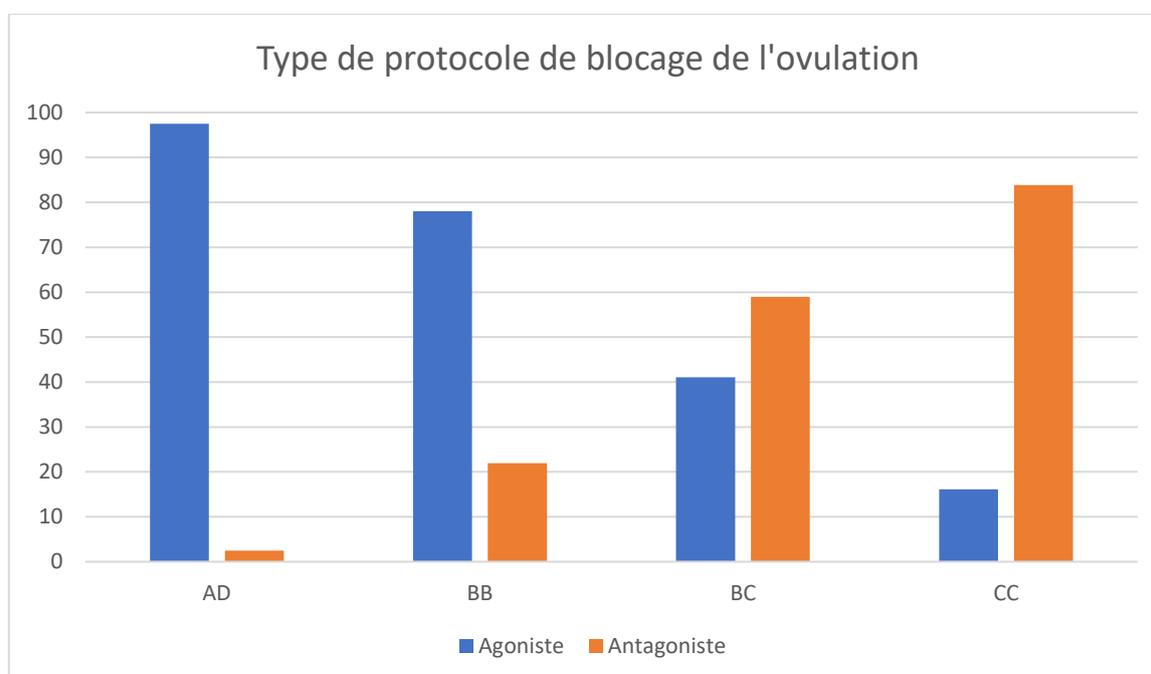


Figure 17 : Répartition des protocoles de blocage de l'ovulation utilisés pour les donneuses ($p=0,001$)

III.2. Impact des milieux sur la survie et le développement embryonnaire précoce

Le tableau 8 présente les résultats des tentatives d'AMP avec ovocytes donnés réchauffés et utilisés en ICSI. 156 tentatives ont été analysées.

L'utilisation des milieux de vitrification spécifique ovocytaire et universels apportent une augmentation significative du taux de survie ovocytaire ($p < 10^{-4}$, AA : 61.2% ; BB : 75.6% ; BC : 85.5% ; CC et 93.7%). En corollaire, le nombre d'ovocytes disponibles pour la micro-injection a augmenté de façon significative entre les groupes ($p = 10^{-4}$).

Il n'existe pas différence significative des taux de fécondation, des taux d'obtention d'embryons clivés et de la qualité embryonnaire à J2 entre les groupes analysés.

A partir de 2016, la culture prolongée a été appliquée pour les tentatives d'ICSI avec les ovocytes donnés et réchauffés se traduisant par une augmentation progressive de l'application de la culture tardive sur les trois groupes concernés (BB : 63,4% ; BC 74,3%, CC 96,7%). Nous n'avons pas observé de différence du taux de blastulation et du taux d'obtention de top blastocystes après utilisation des milieux de vitrification spécifiques ovocyte, universels ou la combinaison des deux (BB : 41,7%, BC : 37,5%, CC : 44,5%, $p > 0,05$).

Groupe	AD	BB	BC	CC	<i>p-value</i>
Nombre moyen d'ovocytes attribués	5,4	6,3	6,4	6	<i>ns</i>
Taux de survie	61,2 ± 21,9*	75,6 ± 19,4**	85,5 ± 17,5	93,7 ± 10,0**	<i>p<0.05</i>
Taux de fécondation	61,7 ± 35,5	68,1 ± 32,4	67,9 ± 23,8	74,9 ± 21,3	<i>ns</i>
Taux d'obtention embryons clivés (J2)	88,8 ± 26,8	89,3 ± 24,6	94,6 ± 17,8	97,9 ± 6,5	<i>ns</i>
Taux de TOP embryons J2	33,2 ± 32,2	38,0 ± 34,2	43,6 ± 31,5	41,6 ± 32,0	<i>ns</i>
Cycles avec culture prolongée (%)	2,5	63,4	74,3	96,7	<i>0.001</i>
Taux de blastulation	0	41,7 ± 40,6	50,3 ± 37,4	46,6 ± 39,6	<i>ns</i>
Taux de TOP blastocystes J5	/	27,0 ± 32,2	37,5 ± 39,6	44,5 ± 41,5	<i>ns</i>

Tableau 8 : Caractéristiques du développement embryonnaire précoce après ICSI avec les ovocytes réchauffés pour les couples receveurs

III.3. Impact des milieux sur les issues de tentatives

Les résultats des issues d'AMP avec transfert d'embryons frais sont présentés dans le tableau 9.

Le transfert embryonnaire au stade de blastocyste a été appliqué de façon plus fréquente pour le groupe universel CC (CC : 17,8%, BC : 2,9%, AA : 0%, BB : 0%, $p=0.03$) (figure 18).

Nous avons observé une tendance de taux d'implantation, de grossesses cliniques et d'accouchements plus faible lorsque le protocole utilisant le milieu ovocytaire BB était utilisé. Lorsque le milieu universel C est utilisé dans un protocole (BC ou CC) les taux d'implantation, de grossesses et d'accouchements étaient similaires au protocole utilisant la combinaison de milieux embryonnaires AD ($p > 0.05$).

Le taux de fausses couches est similaire entre les 4 groupes analysés.

Enfin, l'analyse du taux d'implantation pour 100 ovocytes réchauffés met en évidence une tendance au meilleur rendement de la combinaison de milieux spécifiques embryonnaires (AD : 7,8%) à la limite du seuil de significativité (BB : 2,0%, BC : 5,0%, CC : 4,9%, $p=0,051$).

Groupe	AD	BB	BC	CC	<i>p-value</i>
Nombre moyen d'embryons transférés	1,2	1,2	1,4	1,5	$p=0,39$
Taux de transfert frais J5 (%)	0	0	2,9	17,8	$p=0,003$
Taux d'implantation (%)	32,7	9,4	25	21,4	$p=0,084$
Taux d'implantation pour 100 ovocytes réchauffés (%)	7,8	2,0	5,0	4,9	$p=0,051$
Taux de grossesses par transfert (%)	41,4	13,5	29,4	28,6	$p=0,09$
Taux d'accouchement (%)	27,5	7,3	15,3	19,3	$p=0,157$
Taux de FCS (%)	2,5	4,8	10,2	6,4	$p=0,566$

Tableau 9 : issues des tentatives après transfert frais.

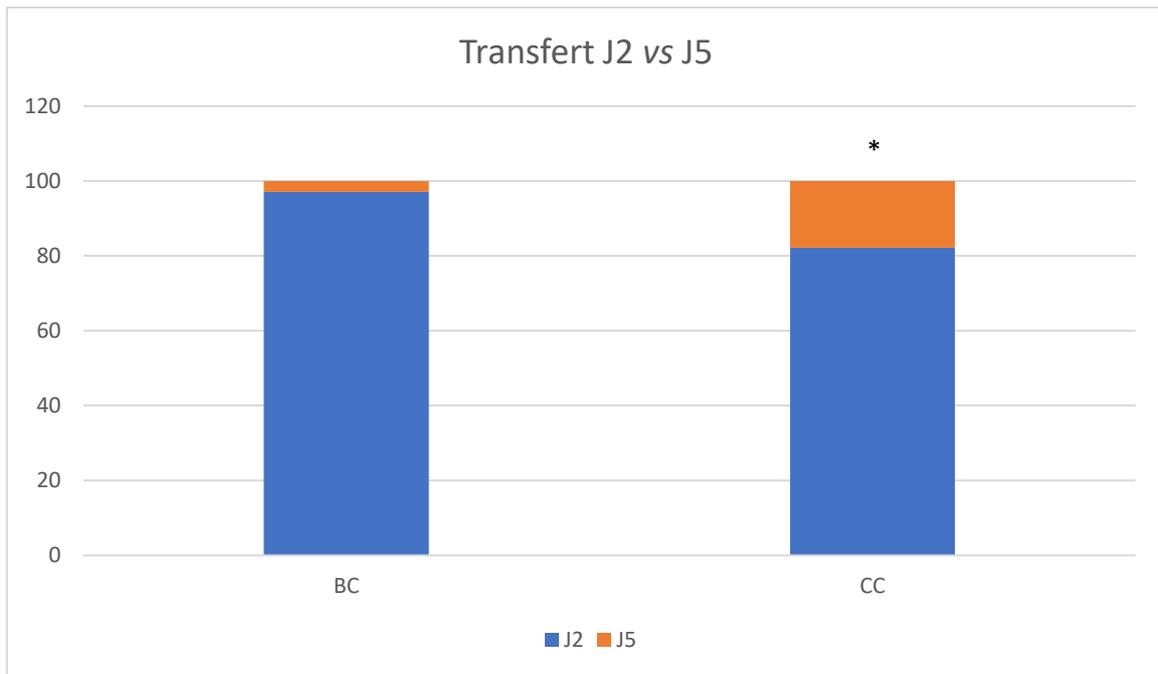


Figure 18 : Transfert d'embryon réalisé au stade précoce (J2) ou tardif (J5) (* $p=0,03$)

IV. Discussion

La méthode de vitrification ovocytaire est aujourd'hui largement utilisée dans les centres d'AMP pour le don d'ovocytes. Apportant des chances de grossesses similaires à l'utilisation d'ovocytes frais (67) elle a pour bénéfice d'optimiser la gestion de l'appariement avec les couples receveurs. Compte tenu de l'application de la vitrification pour la conservation des embryons et des ovocytes dans les laboratoires d'AMP, des milieux de vitrification universels applicables à l'ovocyte et l'embryon sont apparus sur le marché ces dernières années. Notre étude a permis de mettre en évidence l'absence d'influence de l'utilisation du milieu de vitrification universel analysé (Omni™, Vitrolife) sur les chances de grossesses en ICSI avec don d'ovocyte comparé à l'utilisation d'un milieu spécifique ovocytaire (Oocyte™, Vitrolife) ou embryonnaire (Blast™/Cleave™, Vitrolife) dans le service AMP-CECOS du CHU de Clermont Ferrand. Nous avons même pu observer une amélioration du taux de survie ovocytaire lorsque ce milieu universel était utilisé par rapport aux milieux de vitrification spécifiques ovocytaire et embryonnaire.

Il est rassurant d'observer que les résultats obtenus dans notre centre avec l'utilisation du milieu de vitrification universel sont proches de ceux observés sur le plan national. En effet, en 2018, le taux de grossesses cliniques par transfert en AMP pour les receveuses d'ovocytes était en France de 24,5% (105) *versus* 28,6% dans notre centre. Néanmoins, ces résultats restent inférieurs à ce qui est régulièrement rapporté dans la littérature internationale (tableau 10).

Année	Auteur	Nombre d'ovocytes réchauffés	Taux de survie	Taux de fécondation	Taux d'implantation	Taux de grossesse par transfert	Jour du transfert	Nombre moyen d'embryons transférés	Origine des ovocytes	Age moyen des donneuses
2008	Cobo et al.	231	96,9	76,3	40,8	65,2	J2/J3	2,1	Donneuses	26,7
2009	Chian et al.	463	81,4	75,6	19,1	44,7*	J2/J3	3,5	Autologues	31,5
2009	Cao et al.	292	91,8	67,9	/	/	/	/	Don en egg-sharing	/
2010	Rienzi et al.	124	96,7	79,2	20,4	38,5	J2/J3	2,3	Autologues	35,5
2010	Smith et al.	349	81,0	77,0	/	38,0*	J2/J3	/	Autologues	32,0
2010	Cobo et al.	3286	92,5	74,2	39,9	55,4	J2/J3	1,7	Donneuses	26,7
2011	Paffoni et al.	261	57,9	57,6	5,8	7,8*	J2/J3	/	Autologues	34,6
2011	Paffoni et al.	268	82,8	73,0	13,4	26,4*	J2/J3	/	Autologues	35,6
2011	Parmegiani et al.	168	89,9	84,9	17,1	35,5	J2/J3	2,5	Autologues	35,0
2011	Trokoudes et al.	210	91,4	84,4	24,7	55,6	J2/J3	2,3	Don en egg-sharing	29,3
2012	Stoop et al.	123	90,2	77,5	33,3	50,0	J2/J3	/	Donneuses	26,4
2012	Rienzi et al.	2721	84,7	75,2	/	38,1	J2/J3 et J5/J6	1,9	Autologues	36,0
2012	Cai et al.	395	83,0	83,8	25,5	42,3	J2/J3	1,9	Don en egg-sharing	28,2
2013	Machac et al.	/	94,0	76,0	34,4	51,0	J5/J6	1,8	Donneuses	24,6
2015	Cobo et al.	42152	90,4	71,2	39,0	50,8 / 59,9***	J2/J3 et J5/J6	1,9	Donneuses	25,9
2016	De Muncke et al.	793	82,8	76,0	/	/	/	/	Donneuses	29,8
2016	De Muncke et al.	253	93,7	74,3	/	30,0 / 46,2**	J2/J3	1,6	Donneuses	28,0
2016	De Muncke et al.	253	93,7	74,3	16,6 / 27,3**	16,6 / 45,5 **	J2/J3	1,6	Donneuses	28,0
2016	Papatheodorou et al.	984	92,7	81,6	38,9	58,7*	J5/J6	2,0	Donneuses	28,0
2016	Braga et al.	2770	94,4	80,2	43,0	49,6*	J5/J6	1,8	Don en egg-sharing	31,3
2017	Cobo et al.	/	94,5	77,1	36,1 / 49,4***	50,7 / 63,9***	J2/J3 et J5/J6	1,9 / 1,7	Donneuses	26,2
2018	Seshadri et al.	1490	73,6	66,1	/	51,8	J2/J3 et J5/J6	/	Donneuses	26,0
2019	Pujol et al.	474	88,9	69,8	35,1	50,0	J2/J3	1,9	Donneuses	24,8
2019	Pujol et al.	498	94,5	54,1	24,2	40,0	J2/J3	1,8	Donneuses	24,8
2020	Rienzi et al.	1982	86,0*	76,0*	/	/	J2/J3 et J5/J6	/	Donneuses	25,7
2020	Gala et al.	406	82,3	65,2	21,5	32,3	J2/J3	1,6	Donneuses	31,7



Tableau 10 : Principaux résultats rapportés dans la littérature. * résultats par cycle, ** SET vs DET, *** transfert J3 vs J5. Les études surlignées en orange utilisent le diméthylsulfoxyde comme cryoprotecteur (DMSO), les études surlignées en en bleu utilisent le propanediol (PROH)

L'âge de la donneuse est l'un des principaux facteurs prédictifs des chances de grossesse en AMP et ceci en raison d'une plus faible réserve ovarienne et d'une dégradation de la qualité fonctionnelle ovocytaire avec le temps (106). De ce fait, l'utilisation d'ovocytes de donneuses jeunes permet d'améliorer les taux de grossesse, indépendamment de l'âge des receveuses (107,108). Le tableau 10 rapporte des résultats en taux de grossesse supérieurs à 40% pour les cohortes de donneuses dont l'âge moyen est inférieur à 30 ans. En particulier, Cobo *et al* rapportent un taux de grossesse par transfert de 55% pour une population de 25,9 ans d'âge moyen (93) par l'analyse de six années d'expérience de leur centre en Espagne. En France, l'âge moyen des donneuses est plus élevé. En effet, 67,4% des donneuses en 2018 avaient plus de 31 ans (109). Les donneuses prises en compte dans notre étude ont un âge moyen de 31,7 ans. L'expérience du centre d'AMP de Montpellier publiée en 2020 (102) retrouvait un taux de grossesse comparable à celui que nous observons avec l'utilisation du milieu universel (31,7%) pour une population de donneuses d'âge moyen identique. Cette différence d'âge entre les populations de donneuses françaises et étrangères s'explique sans doute du fait de la rémunération du don (110), non autorisée en France (16).

Le nombre d'embryons transférés est également un facteur déterminant pour les chances de grossesses. Le transfert de deux embryons (Double Embryo Transfer, DET) permet l'obtention de taux de grossesses plus élevés que le transfert d'un seul embryon (Single Embryo Transfer, SET) (111) avec néanmoins un risque de grossesse gémellaire plus élevé. La majorité des centres ont un recours prédominant au DET (tableau 10), avec un nombre moyen d'embryons transférés proche de 2 embryons par transfert. Dans notre étude, le nombre moyen d'embryons transférés est compris entre 1,2 et 1,5 selon les groupes, ce qui peut expliquer la discordance entre nos résultats et ceux rapportés dans la littérature. L'étude publiée par le centre de Montpellier (102) retrouvait en effet un taux de grossesse proche de notre groupe « milieu universel » (32,3% vs. 28,6%) pour un nombre moyen d'embryons transférés semblable (1,6 vs.1,5).

L'amélioration des conditions de culture prolongée dans les laboratoires d'AMP a conduit à l'introduction progressive du transfert au stade blastocyste à J5 dans le service avec la mise en place d'une politique de transfert sélective d'un seul blastocyste à J5. Le tableau 10 rapporte l'application de cette stratégie de transfert dont la prévalence dans la littérature a augmenté de façon récente. La réalisation d'un transfert embryonnaire au stade tardif (blastocyste, J5) retrouve de meilleurs taux de grossesse comparé au transfert embryonnaire au stade clivé (J2-J3) (112). Nos résultats n'ont cependant pas retrouvé d'amélioration significative à la suite de l'introduction du transfert à J5 dans les groupes employant le milieu universel. Ceci peut être expliqué par la prévalence encore faible du recours au transfert de blastocyste dans ces groupes.

Une attention particulière doit également être portée à la politique d'attribution des ovocytes par tentative, car le nombre d'ovocytes attribués au couple receveur pour le don est prédictif des chances d'obtention de naissance vivante, avec un seuil rapporté à 8 ovocytes par tentative (90,93,101). En effet, plus le nombre d'ovocytes attribué est élevé et plus le nombre potentiel d'embryons à transférer augmente. Le nombre d'ovocytes attribués dans notre étude



est en moyenne 6 par patiente dans le groupe « milieu universel ». Ceci est en lien avec un pool de donneuses et d'ovocytes disponibles moindre au niveau de notre centre. En raison du plus faible nombre de donneuses en France, le faible nombre d'ovocytes disponibles implique le choix entre une politique d'attribution d'un nombre élevé d'ovocytes pour un nombre plus restreint de couples ou l'attribution d'un nombre plus restreint d'ovocytes pour un nombre plus élevé de couples, comme c'est le cas dans notre centre. Enfin, il faut mettre en regard le nombre d'ovocytes alloués avec le taux de survie ovocytaire. Rienzi *et al.* suggèrent en effet une meilleure efficacité d'un programme de don lorsque le nombre d'ovocytes disponibles après réchauffement est supérieur ou égal à 7, ce qui correspond à une politique d'attribution minimale de 8 ovocytes pour un taux de survie supérieur à 90% (101). Nos résultats retrouvent un taux de survie équivalent avec l'emploi du milieu universel, mais une politique d'attribution moindre en raison du faible pool de donneuse, ce qui contribue à des résultats inférieurs à ceux décrits par Rienzi *et al.* ou Cobo *et al.* (Tableau 10).

Enfin, les modalités de stimulation peuvent avoir un impact sur le nombre d'ovocytes obtenus et par conséquent le nombre d'ovocytes disponibles pour le don. Durant notre période d'étude, le blocage de l'ovulation a d'abord été majoritairement réalisé par triptoréline. Un protocole de type antagoniste a par la suite été progressivement mis en œuvre pour la stimulation des donneuses. Nous avons réalisé une analyse multivariée en incluant ce facteur et n'avons pas retrouvé d'impact de ces protocoles sur les résultats en termes de taux de grossesses, de naissances vivantes et de fausses couches.

En regard de la qualité ovocytaire, nous avons observé une proportion significativement plus faible de donneuses n'ayant jamais procréé dans le groupe employant les milieux embryonnaires (0%). Ceci peut avoir eu un impact sur les bons résultats obtenus dans ce groupe en termes d'issues, car la présence d'un antécédent d'accouchement est un facteur de bon pronostic en AMP (26). A l'époque de l'emploi de ces milieux, le don d'ovocytes était interdit en France aux femmes n'ayant pas encore procréé, ce qui explique cette différence. L'ouverture du don à ces femmes a été effective à compter d'octobre 2015 (113).

Les milieux de vitrification ovocytaire actuellement présents sur le marché sont composés d'une combinaison de deux cryoprotecteurs (CPA) pénétrants. Cette association permet de diminuer leur concentration individuelle et limiter leur toxicité spécifique (114). La combinaison la plus souvent retrouvée associe l'éthylène glycol, un CPA de pénétrance et toxicité faible, à un CPA plus pénétrant mais aussi plus cytotoxique : le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le propanediol (PROH). Le DMSO, aujourd'hui majoritairement représenté dans les milieux de vitrification commercialisés est utilisé depuis le début des années 1970 (45), pour la préservation de différents types de tissus et cellules (58,114). Son utilisation dans les protocoles de conservation gamétiques et embryonnaires est restée limitée dans les années 1980 et 1990 en raison de meilleurs résultats obtenus par le PROH dans les protocoles de congélation lente (6,115). Il est admis depuis les années 80 (114) que la toxicité spécifique des CPA sur les organes et tissus résulte de mécanismes biochimiques directement liés aux propriétés physico-chimiques des molécules employées et de leur interaction avec les multiples composants présents dans les tissus et cellules-cibles. Bien que ces mécanismes ne soient pas tous élucidés et parfaitement compris pour chaque CPA et chaque combinaison de CPA, chacun d'entre eux présente des propriétés qui leur sont propres et dont l'action est majorée par l'élévation de la température du milieu, l'augmentation de la concentration du CPA, l'allongement du temps de contact avec la cellule ou le tissu et la nature de ces derniers

(58,60,61,66). C'est l'une des raisons pour lesquelles le DMSO, dont les capacités de dénaturation protéique, d'interaction avec le fuseau méiotique et potentiellement de remaniement épigénétique dans certains types cellulaires (58,61,116) a été longtemps écarté des protocoles de cryopréservation gamétique (87,91). Par ses résultats supérieurs, le PROH, considéré comme moins toxique, a été largement employé dans les protocoles de congélation lente. Toutefois, l'émergence de la vitrification avec la mise en œuvre de temps de contacts limités avec les CPA a permis un nouvel essor de l'utilisation du DMSO, notamment suite à la description du protocole de vitrification embryonnaire et ovocytaire par Kuwayama (65,103). Parallèlement, des protocoles de vitrification DMSO-free ont été décrits (85), donnant naissance à l'émergence de kits employant le PROH (MediCult Vitrification Cooling, Cooper Surgical® ; RapidVit™ Blast, Vitrolife). Le PROH a pour particularité d'avoir une pénétrance optimale à 37°C, tandis que le DMSO a une pénétrance optimale à température ambiante. Ceci présente l'avantage de maintenir l'ovocyte ou l'embryon à température physiologique et préserve l'organisation du fuseau méiotique, vulnérable aux baisses de température (66). De plus, le maintien de la température à 37°C est présenté comme apportant des bénéfices en termes de stabilité et de reproductibilité de la technique, comparé à la mise en œuvre de protocoles en « température ambiante », ce qui peut désigner une plage de températures variables et moins reproductibles. Néanmoins, le maintien de la température à 37° présente une contrainte matérielle et technique et augmente également potentiellement la pénétrance et la toxicité de l'éthylène glycol. Enfin, le PROH présente lui-aussi des mécanismes de toxicité cellulaire. En effet, il lui a été imputé une génotoxicité sur les ovocytes de souris (60), une toxicité par production de formaldéhyde intracellulaire (61), une déstabilisation du fuseau méiotique et du cytosquelette (7) et une élévation des niveaux de calcium intracellulaire (117). Il est cependant difficile de généraliser ces résultats en regard de la variabilité importante des protocoles employés (température, durée d'exposition), parfois relativement éloignés des conditions d'emploi réelles en AMP et souvent obtenus après étude de gamètes et/ou embryons de souris ou d'autres mammifères.

Les autres études rapportées dans la littérature employant du PROH comme CPA ont mis en évidence des taux de survie supérieurs à 80% (tableau 10), comparables avec nos résultats lorsque le milieu universel était employé. Seules deux de ces études rapportent l'utilisation du milieu de vitrification RapidVit™ Oocyte (92,100). A notre connaissance aucune étude publiée ne rapporte jusqu'alors des résultats après utilisation du milieu universel RapidVit™ Omni pour la vitrification ovocytaire.

Contrairement aux protocoles de congélation lente, aucune association de CPA ne s'est imposée sur l'autre pour la vitrification et d'excellents résultats ont été rapportés dans la littérature avec des combinaisons différentes (tableau 10). Il n'existe pas à notre connaissance d'études rapportant une comparaison stricte de l'emploi de deux combinaisons de milieux de CPA pour la vitrification ovocytaire chez l'homme. En 2019, l'équipe de Pujol (100), en comparant un système ouvert *versus* un système fermé, a également comparé deux protocoles employant des CPA différents (EG + DMSO *vs* EG + PROH). L'étude a permis de montrer un taux de survie augmenté avec l'emploi du PROH (94.5% *versus* 88.9%, $p=0.002$), mais un taux de fécondation diminué (57.1% *versus* 69.8%, $p<0.001$). De plus, les résultats rapportés par cette étude quant au développement embryonnaire et les issues obstétricales ne montraient pas de différence significative entre les deux groupes. Il est cependant difficile de conclure la supériorité d'une combinaison par rapport à l'autre à partir de cette étude en raison de la différence des supports de vitrification (ouverts *versus* fermés) employés. L'impact de ceux-ci sur les résultats est disputé dans la littérature. Une récente méta-analyse montrait

une absence de différence sur le taux de survie entre les deux systèmes de support avec néanmoins une tendance à de meilleurs taux d'implantation avec les supports dits ouverts (118). A ce jour, la supériorité d'un CPA sur l'autre en termes de résultats pour la vitrification ovocytaire ne semble donc toujours pas établie et il n'existe de fait pas de recommandations claires d'utilisation d'une association de CPA par rapport à une autre (119).

Les concentrations des CPA contenus dans les milieux de vitrification n'étant pas transmises par les fournisseurs, il est également complexe d'évaluer l'impact éventuel de ce paramètre, en particulier dans nos résultats. La concentration des CPA est un paramètre majeur de la bonne réussite des processus de vitrification et de réchauffement, car elle permet une déshydratation optimale de la cellule (réduisant ainsi le risque de cristallisation intracellulaire), une régulation harmonieuse des échanges osmotiques (limitant le risque de choc osmotique, particulièrement au réchauffement) et l'augmentation de la viscosité du milieu, ce qui influence directement sur la probabilité de vitrification (7,61,62,120). Enfin, cette concentration doit être adaptée en fonction de la toxicité des CPA. L'adjonction éventuelle d'autres molécules (calcium, molécules antigels), n'est pas mentionnée dans les milieux que nous avons employés dans notre étude. Ceci est particulièrement important car les principaux CPA employés dans le commerce (DMSO, EG et PROH) peuvent entraîner une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire dans l'ovocyte, ce qui peut aboutir à une activation ovocytaire avec notamment une exocytose des granules corticaux et durcissement de la zone pellucide (117,121,122). L'étude de la physiologie de ce mécanisme chez la souris montre une correction de ce phénomène avec l'emploi de milieux dépourvus de calcium lorsque l'EG et le PROH sont employés, suggérant un mécanisme de toxicité de ces cryoprotecteurs par entrée de calcium extra-cellulaire (121). Néanmoins, les études présentées ne définissent pas ce qui constitue un milieu « dépourvu de calcium », à savoir si ces milieux ne contiennent qu'un seuil minimal d'ions calcium qui serait considéré comme non toxique chez la souris ou n'en contiennent pas du tout. En l'absence d'informations sur l'éventuelle présence et concentration en ions calcium dans ces différents milieux, il est difficile d'évaluer l'éventuel impact de ce dernier sur nos résultats. Il pourrait être intéressant de mesurer la présence de calcium dans ces milieux. Enfin, des disaccharides naturels ou des polymères synthétiques peuvent être utilisés comme CPA non pénétrants dans les protocoles de vitrification. C'est le cas du Ficoll, présent dans le milieu spécifique embryonnaire et remplacé par le sucrose dans les milieux ovocytaire et universel utilisés dans notre étude. L'étude du taux d'implantation pour 100 ovocytes réchauffés permet la comparaison des protocoles en prenant en compte la survie ovocytaire, ce qui définit le « rendement » du protocole (7). Nous avons observé avec le milieu de vitrification/réchauffement embryonnaire un bon rendement d'implantation malgré une survie des ovocytes après réchauffement inférieure aux autres protocoles analysés. L'amélioration du taux de survie avec ce protocole pourrait probablement permettre d'obtenir de meilleurs résultats. La présence de Ficoll dans le milieu embryonnaire a peut-être eu un impact sur la déshydratation ovocytaire lors de l'étape de vitrification.

Outre la composition des milieux de vitrification, il est important de prendre en compte les protocoles employés. Ceux-ci diffèrent par les temps d'exposition et les volumes des différentes solutions employés (60). Ces paramètres sont fondamentaux car ils conditionnent le processus de déshydratation et de remplacement de l'eau intra-cellulaire par les CPA afin de favoriser un état vitreux. Ils doivent donc être adaptés pour permettre une pénétration complète et contrôlée des CPA et une réhydratation progressive lors du réchauffement

(7,66,120). Ceci représente une contrainte particulière pour l'utilisation d'un milieu universel, car la perméabilité de l'eau et des CPA est très différente entre l'ovocyte et l'embryon à ses différents stades de développement. Les mouvements aqueux et de CPA se font préférentiellement de façon passive au travers de la membrane plasmique ovocytaire alors que pour le blastocyste ces mouvements sont réalisés par des canaux spécifiques, en particulier le déplacement de l'eau par des aquaporines (123). L'ovocyte est l'une des cellules les plus volumineuses du corps humain et présente une forme sphérique avec un faible ratio surface/volume, ce qui en fait une cellule résistante à la pénétration des CPA. Ceci expose au risque de pénétration incomplète, avec développement d'un gradient de concentration de l'espace sous-membranaire vers le centre de la cellule (66,120). Le blastocyste est quant à lui composé de deux populations cellulaires et seules les cellules du trophoblaste sont directement en contact avec le milieu extra-cellulaire ; les cellules de la masse cellulaire interne sont exposées à une cavité liquidienne intracellulaire (le blastocèle) et moins aisément accessibles pour les CPA. Le blastocèle représente par ailleurs un risque propre lors du processus de vitrification/réchauffement. En effet, en présence d'eau résiduelle dans cette cavité, il existe un risque délétère de recristallisation lors du réchauffement. C'est pourquoi certains fournisseurs recommandent la réalisation d'un collapse mécanique du blastocèle avant la vitrification, à l'aide d'une pipette de biopsie ou d'un laser (120,124). En raison de ces particularités, les fournisseurs de milieu universel recommandent le plus souvent des durées d'exposition différentes selon le type cellulaire (78,84,124). Enfin, les protocoles de vitrification des milieux ovocytaires et universels ont souligné l'importance de la prise en compte du phénomène de rétraction et ré-expansion de l'ovocyte dans le protocole d'équilibration (figure 14). Lors de l'équilibration, l'eau sort plus rapidement de la cellule que ne pénètrent les cryoprotecteurs (66). Cela aboutit à un collapsus apparent de l'ovocyte qui reprend sa forme dans les secondes ou minutes suivantes au gré de la pénétration des CPA. La bonne ré-expansion de l'ovocyte est alors le reflet de l'équilibration complète. Le contrôle de cette bonne équilibration n'était pas décrit dans le protocole de vitrification du milieu embryonnaire, ce qui peut expliquer le taux de survie plus faible dans ce groupe. Par ailleurs, ce phénomène étant peu maîtrisé par l'équipe lors de son introduction avec le protocole de vitrification ovocytaire, les taux de survie de ce groupe étaient également initialement plus faibles. La mise en place d'une action corrective au niveau du centre avec formation spécifique à l'observation à la loupe de ce phénomène ont sans doute permis d'optimiser les taux de survie par la suite.

Pour le réchauffement des ovocytes, il est utilisé dans la majorité des protocoles disponibles sur le marché des CPA non pénétrants avec des concentrations décroissantes de sucrose ou tréhalose pour optimiser la réhydratation progressive et adaptée des ovocytes. Les travaux de l'équipe de Parmegiani *et al.* (2014, 2018) suggèrent la possibilité d'une interchangeabilité entre les kits de réchauffement disponibles sur le marché si le protocole de réchauffement utilise des solutions de CPA extracellulaires à concentration élevée (1M puis 0,5M) (125,126). Nos travaux semblent confirmer cette conclusion avec des résultats comparables lorsque le milieu universel est utilisé pour le réchauffement, indépendamment du milieu de vitrification employé (ovocytaire/universel ou universel/universel).

Le développement de la technique de vitrification/réchauffement dans les laboratoires d'AMP a permis d'optimiser de façon importante les taux de survie ovocytaire et les chances de grossesses (41). Néanmoins, la vitrification reste une technique manuelle qui nécessite une courbe d'apprentissage (7,120,127), ce qui peut constituer un biais dans notre étude et

expliquer l'amélioration progressive de nos résultats. Le suivi de critères stricts d'habilitation et de maintien des compétences ainsi que le maintien d'une activité adéquate de vitrification et réchauffement ovocytaire permettent de maîtriser ce biais potentiel. Dans la littérature, les équipes spécialisées et présentant un volume d'activité important ont publié des séries présentant des résultats excellents en termes de taux de survie et de taux de grossesse (87,93,97,99). Le développement récent de systèmes de vitrification semi-automatisés permettront très certainement à moyen terme d'éviter la variabilité inter-opérateurs et permettre une bonne reproductibilité quel que soit le nombre d'ovocytes vitrifiés. Actuellement, le système Gavi® (Genea Biomedx) permet l'équilibration et la vitrification automatisée d'embryons (128) et d'ovocytes (129) sur des supports spécifiques (120). Les premiers résultats semblent montrer une non-infériorité de la procédure vis-à-vis des pratiques manuelles (130). Néanmoins l'intérêt en termes d'efficacité est encore à l'étude. Enfin, ce système a pour limite de ne pas encore permettre le réchauffement automatisé des gamètes, or le réchauffement est une période cruciale du processus de cryopréservation.

V. Conclusion

En conclusion, l'utilisation d'un milieu universel pour la vitrification et le réchauffement n'a pas eu d'impact délétère sur les taux de grossesses en AMP avec don d'ovocytes d'une part et a permis d'améliorer les taux de survie ovocytaire d'autre part. L'optimisation de la composition des milieux et l'apprentissage des techniques de vitrification/réchauffement ont sans doute contribué à cette amélioration. L'étude comparative des résultats reste néanmoins délicate en l'absence d'une connaissance exacte de la composition des milieux employés aussi bien pour la vitrification que le réchauffement. Enfin, cette étude est limitée par son caractère rétrospectif : une étude prospective serait ainsi nécessaire pour compléter cette analyse.

Références bibliographiques

1. Article L2141-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 22 févr 2021]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000024325489/2011-07-09
2. Steptoe PC, Edwards RG. BIRTH AFTER THE REIMPLANTATION OF A HUMAN EMBRYO. *The Lancet*. 12 août 1978;312(8085):366.
3. Ombelet W, Van Robays J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Views Vis Obgyn*. 2015;7(2):137-43.
4. Bujan L. HISTOIRE DES CECOS : une œuvre collective. *LA REVUE DU PRATICIEN*. 2018;68:5.
5. Chen C. PREGNANCY AFTER HUMAN OOCYTE CRYOPRESERVATION. *The Lancet*. 19 avr 1986;327(8486):884-6.
6. Gook DA. History of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. sept 2011;23(3):281-9.
7. Chian R-C, Quinn P. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press; 2010.
8. Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod*. oct 1998;13(10):2874-9.
9. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod*. déc 1999;14(12):3077-9.
10. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 8 nov 2016;humupd;dmw038v1.
11. Rienzi LF, Iussig B, Dovere L, Fabozzi G, Cimadomo D, Ubaldi FM. Perspectives in Gamete and Embryo Cryopreservation. *Semin Reprod Med*. sept 2018;36(5):253-64.
12. Haute Autorité de Santé. Évaluation des actes de vitrification et réchauffement ovocytaire - vitrification et réchauffement embryonnaire. 2017;75.
13. LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (1). 2011-814 juill 7, 2011.
14. Article L2141-2 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038310837/
15. Arrêté du 30 juin 2017 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 modifié relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.
16. LOI no 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal (1). 94-654 juill 29, 1994.
17. Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique (1). mars 1, 2021.

18. Projet de Loi de Bioéthique 2021 [Internet]. Assemblée nationale. [cité 8 juill 2021]. Disponible sur: https://www.assemblee-nationale.fr/dyn/15/dossiers/bioethique_2
19. Le cycle menstruel [Internet]. [cité 24 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.cngof.fr/communiqués-de-presse/103-le-cycle-menstruel>
20. Young J, Gougeon A, G S. Le cycle ovarien. *Medecine sciences: M/S*. 1 févr 1999;15:183-90.
21. Abbara A, Clarke SA, Dhillon WS. Novel Concepts for Inducing Final Oocyte Maturation in In Vitro Fertilization Treatment. *Endocr Rev*. 2 juill 2018;39(5):593-628.
22. Coticchio G, Dal Canto M, Mignini Renzini M, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D, et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*. 1 juill 2015;21(4):427-54.
23. La fécondation dans l'espèce humaine [Internet]. EM-Consulte. [cité 7 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/es/article/1373203/la-fecondation-dans-l-espece-humaine>
24. Embryologie [Internet]. EM-Consulte. [cité 7 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/es/article/1429691/figures/embryologie>
25. Cycle menstruel [Internet]. EM-Consulte. [cité 7 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/275704/cycle-menstruel>
26. Frydman R. Infertilité : prise en charge globale et thérapeutique. Elsevier-Masson; (Pratique en gynécologie obstétrique).
27. Henkel RR, Schill W-B. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 14 nov 2003;1:108.
28. Henkel R, Müller C, Stalf T, Schill W-B, Franken DR. Use of Failed-Fertilized Oocytes for Diagnostic Zona Binding Purposes After Sperm Binding Improvement with a Modified Medium. *J Assist Reprod Genet*. janv 1999;16(1):24-9.
29. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 4 juill 1992;340(8810):17-8.
30. Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, Cheung S, Parrella A, Pereira N, et al. Intracytoplasmic sperm injection: state of the art in humans. *Reproduction*. 5 déc 2017;154(6):F93-110.
31. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting†. *Human Reproduction*. 1 juin 2011;26(6):1270-83.
32. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. juin 1999;11(3):307-11.
33. LOI no 94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal (1). 94-654 juill 29, 1994.
34. Le don d'ovocytes depuis la loi de bioéthique. Implications médicales, éthiques et juridiques déduites d'une série de 300 cas à l'hôpital Tenon – Académie nationale de

médecine | Une institution dans son temps [Internet]. [cité 1 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/le-don-dovocytes-depuis-la-loi-de-bioethique-implications-medicales-ethiques-et-juridiques-deduites-dune-serie-de-300-cas-a-lhopital-tenon/>

35. Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique (1).
36. LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (1). 2011-814 juill 7, 2011.
37. Agence de la biomédecine - rapport d'activité 2019 [Internet]. [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <https://rams.agence-biomedecine.fr/principaux-chiffres-de-lactivite>
38. Cobo A. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. 2010;9.
39. Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertility and Sterility*. mai 2011;95(6):1996-2000.
40. Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Vaiarelli A, Dusi L, Buffo L, et al. Definition of a clinical strategy to enhance the efficacy, efficiency and safety of egg donation cycles with imported vitrified oocytes. *Human Reproduction*. 28 avr 2020;35(4):785-95.
41. Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertility and Sterility*. 1 nov 2010;94(6):2088-95.
42. Dictionnaire de l'Académie française [Internet]. [cité 10 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.dictionnaire-academie.fr/article/A9C3574>
43. Smith GD, Motta EE, Serafini P. Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*. sept 2011;23(3):298-306.
44. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 15 oct 1949;164(4172):666.
45. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*. 27 oct 1972;178(4059):411-4.
46. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril*. déc 1954;5(6):520-9.
47. Zeilmaker GH, Alberda ATh, van Gent I, Rijkmans CPM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*. 1 août 1984;42(2):293-6.
48. van Uem JF, Siebzehrübl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet*. 28 mars 1987;1(8535):752-3.
49. Barg PE, Barad DH, Feichtinger W. Ultrarapid freezing (URF) of mouse and human preembryos: A modified approach. *J Assist Reprod Genet*. 1 déc 1990;7(6):355-7.
50. Anderson N. The Many Phases of Ice [Internet]. 2009 [cité 10 juill 2021]. Disponible sur: https://web.archive.org/web/20091007073915/http://atom.me.gatech.edu/zhut/Courses/Courses_HarvardCollection/caiwei/phasesofice.pdf

51. doktorholz. Ice Ih [Internet]. The Fascination of Crystals and Symmetry. 2018 [cité 10 juill 2021]. Disponible sur: <https://crystalsymmetry.wordpress.com/2018/04/01/ice-ih/>
52. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res.* 1972;71(2):345-55.
53. Lovelock JE. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. *Proc R Soc Med.* janv 1954;47(1):60-2.
54. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* mars 2017;6(1):12-8.
55. Raoult's law [Internet]. Encyclopedia Britannica. [cité 10 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.britannica.com/science/liquid-state-of-matter>
56. Karow AM. Cryoprotectants—a new class of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1969;21(4):209-23.
57. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology.* févr 2010;60(1):11-22.
58. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology.* juin 2017;76:74-91.
59. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 4 mars 2021]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1472648310617804?token=BB084EDC0D74CBB5DAD47AE5C10802C46F6691135019A8A13EC0DC1C919C4A058798ED28A3D132774FDB1DC26CF9A144>
60. Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology.* juill 2010;48(7):1905-12.
61. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research.* oct 2015;18(5):422-36.
62. Lawson A, Ahmad H, Sambanis A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology.* avr 2011;62(2):115-22.
63. Mandelbaum-Bleibtreu J, de Larouzière V, Berthaut I, Beaudelot F, Mathieu E, Verstraete L, et al. Congélation lente ou vitrification en AMP: Que choisir ? 2008;33.
64. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling¹. *Biology of Reproduction.* 1 mai 1996;54(5):1059-69.
65. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online.* 1 janv 2005;11(3):300-8.
66. Fahy GM, Wowk B. Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol.* 2015;1257:21-82.

67. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility*. juin 2008;89(6):1657-64.
68. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. sept 1998;51(1):53-8.
69. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril*. janv 2006;85(1):108-11.
70. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK, Phil D. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*. déc 1999;72(6):1073-8.
71. Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biol Endocrinol*. 15 mai 2013;11:41.
72. De Munck N, Vajta G. Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology*. oct 2017;78:119-27.
73. Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril*. oct 2012;98(4):870-5.
74. Journal Officiel de l'Union Européenne. Directive 2006/17/CE de la commission du 8 février 2006 [Internet]. [cité 11 juill 2021]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:038:0040:0052:FR:PDF>
75. Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*. avr 2015;30(4):325-33.
76. Larman MG, Gardner DK. Vitrification of mouse embryos with super-cooled air. *Fertility and Sterility*. 15 mars 2011;95(4):1462-6.
77. VitriFit Open Carrier [Internet]. CooperSurgical Fertility Companies. [cité 4 mars 2021]. Disponible sur: https://fertility.coopersurgical.com/art_devices/vitri-fit-open-carrier/
78. Vitrification and Thawing Media [Internet]. Kitazato IVF. [cité 11 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.kitazato-ivf.com/vitrification/vitrification-thawing-media/>
79. FUJIFILM Irvine Scientific A.R.T. Europe - Vit Kit - Warm NX, FUJIFILM Irvine Scientific [Internet]. [cité 11 juill 2021]. Disponible sur: <http://irvinescientific-art-eu.fujifilm.com/fr/cryopreservation/slowfreezing-and-thawing/vit-kit-warm-nx-fujifilm-irvine-scientific.html>
80. Jin B, Mazur P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Sci Rep*. août 2015;5(1):9271.
81. Stoop D, De Munck N, Jansen E, Platteau P, Van den Abbeel E, Verheyen G, et al. Clinical validation of a closed vitrification system in an oocyte-donation programme. *Reproductive BioMedicine Online*. févr 2012;24(2):180-5.

82. Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli 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.* janv 2010;25(1):66-73.
83. Vitrolife - RapidVit™ & RapidWarm™ Oocyte [Internet]. [cité 11 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.vitrolife.com/products/cryopreservation/rapidvit-and-rapidwarm-oocyte/>
84. Vitrolife - RapidVit™ & RapidWarm™ Omni [Internet]. Vitrolife. [cité 11 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.vitrolife.com/products/cryopreservation/rapidvit-rapidwarm-omni/>
85. Chian R-C, Huang JYJ, Gilbert L, Son W-Y, Holzer H, Cui SJ, et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. *Fertility and Sterility.* 1 juin 2009;91(6):2391-8.
86. Cao Y-X, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang Z-G, Wei Z-L, et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertility and Sterility.* 1 oct 2009;92(4):1306-11.
87. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human Reproduction.* 1 sept 2010;25(9):2239-46.
88. Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, Restelli L, Nicolosi AE, Scarduelli C, et al. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online.* mars 2011;22(3):292-8.
89. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, et al. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* oct 2011;23(4):505-12.
90. Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G, et al. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod.* juin 2012;27(6):1606-12.
91. Cai L-B, Qian X-Q, Wang W, Mao Y-D, Yan Z-J, Liu C-Z, et al. Oocyte vitrification technology has made egg-sharing donation easier in China. *Reproductive BioMedicine Online.* févr 2012;24(2):186-90.
92. Machac S, Hubinka V, Larman M, Koudelka M. A novel method for human oocyte vitrification with a closed device using super-cooled air. *Fertility and Sterility.* 1 sept 2013;100(3):S108.
93. Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohí J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertility and Sterility.* déc 2015;104(6):1426-1434.e8.
94. De Munck N, Belva F, Van de Velde H, Verheyen G, Stoop D. Closed oocyte vitrification and storage in an oocyte donation programme: obstetric and neonatal outcome. *Hum Reprod.* mai 2016;31(5):1024-33.
95. De Munck N, Santos-Ribeiro S, Stoop D, Van de Velde H, Verheyen G. Open versus closed oocyte vitrification in an oocyte donation programme: a prospective randomized sibling oocyte study. *Hum Reprod.* févr 2016;31(2):377-84.

96. Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Petousis S, Gullo G, Kasapi E, et al. How does closed system vitrification of human oocytes affect the clinical outcome? A prospective, observational, cohort, noninferiority trial in an oocyte donation program. *Fertility and Sterility*. nov 2016;106(6):1348-55.
97. Braga DPAF, Setti AS, Figueira RCS, Azevedo M de C, Iaconelli A, Lo Turco EG, et al. Freeze-all, oocyte vitrification, or fresh embryo transfer? Lessons from an egg-sharing donation program. *Fertility and Sterility*. sept 2016;106(3):615-22.
98. Cobo A, Coello A, Remohí J, Serrano J, de los Santos JM, Meseguer M. Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertility and Sterility*. sept 2017;108(3):491-497.e3.
99. Seshadri S, Saab W, Exeter H, Drew E, Petrie A, Davies M, et al. Clinical outcomes of a vitrified donor oocyte programme: A single UK centre experience. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. juin 2018;225:136-40.
100. Pujol A, Zamora MJ, Obradors A, Garcia D, Rodriguez A, Vassena R. Comparison of two different oocyte vitrification methods: a prospective, paired study on the same genetic background and stimulation protocol. *Human Reproduction*. 4 juin 2019;34(6):989-97.
101. Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Vaiarelli A, Dusi L, Buffo L, et al. Definition of a clinical strategy to enhance the efficacy, efficiency and safety of egg donation cycles with imported vitrified oocytes. *Human Reproduction*. 28 avr 2020;35(4):785-95.
102. Gala A, Ferrières- Hoa A, Loup-Cabaniols V, Fournier A, Anav M, Brunet C, et al. Closed vitrification system and egg donation: Predictive factors of oocyte survival and pregnancy. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. mars 2020;49(3):101687.
103. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 1 janv 2007;67(1):73-80.
104. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*. sept 2017;108(3):393-406.
105. Agence de la biomédecine [Internet]. [cité 8 août 2021]. Disponible sur: <https://rams.agence-biomedecine.fr/don-dovocytes-0>
106. Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet*. 18 juin 2012;13(7):493-504.
107. Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA. Reversing the Natural Decline in Human Fertility: An Extended Clinical Trial of Oocyte Donation to Women of Advanced Reproductive Age. *JAMA*. 9 sept 1992;268(10):1275-9.
108. Sauer MV. The impact of age on reproductive potential: lessons learned from oocyte donation. *Maturitas*. 12 oct 1998;30(2):221-5.
109. Agence de la biomédecine - rapport d'activité 2019 [Internet]. 2021 [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <https://rams.agence-biomedecine.fr/principaux-chiffres-de-lactivite>
110. Bracewell-Milnes T, Saso S, Bora S, Ismail AM, Al-Memar M, Hamed AH, et al. Investigating psychosocial attitudes, motivations and experiences of oocyte donors,

- recipients and egg sharers: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 1 juin 2016;22(4):450-65.
111. Kamath MS, Mascarenhas M, Kirubakaran R, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev*. 21 août 2020;8:CD003416.
 112. Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 30 juin 2016;(6):CD002118.
 113. Décret n° 2015-1281 du 13 octobre 2015 relatif au don de gamètes. 2015-1281 oct 13, 2015.
 114. Fahy GM, Levy DI, Ali SE. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*. juin 1987;24(3):196-213.
 115. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril*. nov 1985;44(5):645-51.
 116. Weng L, Beauchesne PR. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology*. juin 2020;94:9-17.
 117. Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK. 1,2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. *Human Reproduction*. janv 2007;22(1):250-9.
 118. Youm HS, Choi J-R, Oh D, Rho YH. Closed versus open vitrification for human blastocyst cryopreservation: A meta-analysis. *Cryobiology*. août 2017;77:64-70.
 119. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society of Reproductive Biologists and Technologists. Electronic address: jgoldstein@asrm.org. A review of best practices of rapid-cooling vitrification for oocytes and embryos: a committee opinion. *Fertil Steril*. févr 2021;115(2):305-10.
 120. Tucker M, éditeur. *Vitrification in Assisted Reproduction*. CRC Press; (Reproductive Medicine and Assisted Reproductive Techniques Series).
 121. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction*. janv 2006;131(1):53-61.
 122. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 1 janv 2007;67(1):64-72.
 123. Edashige K. The movement of water and cryoprotectants across the plasma membrane of mammalian oocytes and embryos and its relevance to vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 2016;62(4):317-21.
 124. Medicult Vitrification Cooling Medium [Internet]. [cité 21 juill 2021]. Disponible sur: <https://coopersurgical.marketport.net/MarketingZone/MZDirect/Source/b50748a8-9b79-4ce2-8303-4b61f629c06e>

125. Parmegiani L, Beilby KH, Arnone A, Bernardi S, Maccarini AM, Nardi E, et al. Testing the efficacy and efficiency of a single “universal warming protocol” for vitrified human embryos: prospective randomized controlled trial and retrospective longitudinal cohort study. *J Assist Reprod Genet.* oct 2018;35(10):1887-95.
126. Parmegiani L, Arnone A, Cognigni G, Quintero L, Viioles R, Filicori M. “universal warming protocol” for a transnational egg donation program with vitrified oocytes. *Fertility and Sterility.* sept 2018;110(4):e230-1.
127. Dessolle L, Biau DJ, de Larouzière V, Ravel C, Antoine J-M, Daraï E, et al. Learning curve of vitrification assessed by cumulative summation test for learning curve (LC-CUSUM). *Fertil Steril.* sept 2009;92(3):943-5.
128. Roy TK, Brandi S, Tappe NM, Bradley CK, Vom E, Henderson C, et al. Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields in vitro outcomes equivalent to the manual Cryotop method. *Hum Reprod.* nov 2014;29(11):2431-8.
129. Brunetti XO, Cawood S, Gaunt M, Saab W, Serhal P, Seshadri S. The First Livebirth Using Warmed Oocytes by a Semi-Automated Vitrification Procedure. *J Reprod Infertil.* mars 2021;22(1):70-2.
130. Hajek J, Baron R, Sandi-Monroy N, Schansker S, Schoepper B, Depenbusch M, et al. A randomised, multi-center, open trial comparing a semi-automated closed vitrification system with a manual open system in women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 19 juill 2021;36(8):2101-10.

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Comparaison de l'impact des milieux de vitrification et de réchauffement ovocytaire sur les taux de grossesses en don d'ovocyte.

Introduction : la vitrification a permis d'optimiser la gestion du don d'ovocytes. Des milieux spécifiques à la vitrification de l'embryon ou de l'ovocyte puis des milieux universels ont été progressivement mis sur le marché. L'objectif de notre étude est de comparer les résultats que nous avons obtenus en taux de grossesse après l'utilisation successive de milieux de vitrification/réchauffement spécifiques embryonnaires, ovocytaires puis universels pour le don d'ovocytes.

Matériel et méthodes : il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique. 110 dons d'ovocytes ont été attribués pour 106 couples receveurs sur la période du 30/01/2014 au 02/07/2020. 156 tentatives d'ICSI ont été analysées. Quatre sous-groupes ont été comparés en fonction de la combinaison des milieux de vitrification et de réchauffement utilisés.

Résultats : l'introduction du milieu universel a amélioré les taux de survie ovocytaire par rapport aux autres combinaisons de milieux ($p < 0,05$). Nous n'avons pas observé de différence entre les combinaisons de milieux sur le développement embryonnaire précoce ni sur les issues de grossesse.

Conclusion : l'utilisation d'un milieu universel pour la vitrification et le réchauffement ovocytaire n'a pas eu d'impact délétère sur les taux de grossesses en AMP avec don d'ovocytes d'une part et a permis d'améliorer les taux de survie ovocytaire d'autre part. L'optimisation de la composition des milieux et l'apprentissage des techniques de vitrification/réchauffement ont sans doute contribué à cette amélioration. Une étude prospective serait nécessaire pour compléter cette analyse.

Mots-clés : vitrification, don d'ovocyte, milieux de vitrification, cryoprotecteurs, AMP

Impact of vitrification and warming media on pregnancy rates in an oocyte donation program

Introduction : the use of vitrification has improved the management of oocyte donation programs. At first specific embryo and oocyte media were used to vitrify the oocytes. Afterwards universal media which may be used for oocyte and/or embryo vitrification were commercialized by manufacturers. The aim of this study was to compare the impact on pregnancy rates of these three types of media in our oocyte donation program.

Materials and methods : this is a retrospective and monocentric study. 110 oocyte donations were assigned to 106 recipients from 30/01/2014 to 02/07/2020. 156 ICSI cycles were included. Data analysis was performed in four subgroups according to the combination of vitrification and warming media used at the time of the procedure.

Résultats : Survival rates were improved when the universal vitrification and/or warming media were used ($p < 0,05$). There were no significant differences in embryo development and obstetrical outcomes.

Conclusion : the use of a universal vitrification medium did not hinder pregnancy rates in our donation program, and improved oocyte survival rates. The optimization of the media composition and experience-related improvement of technical proficiency may explain these results. A prospective study seems required to confirm these preliminary data.

Keywords : vitrification, oocyte donation, vitrification media, cryoprotectants, CPA, ART

