

La vitrification ovocytaire : un outil d'avenir

Pierre Boyer, Debbie Montjean, Cendrine Siraudin et Marie Gervoise-Boyer

Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, Hôpital Saint Joseph, 26 boulevard de Louvain, 13008 Marseille, France

Auteur correspondant : Pierre Boyer, pboyer@hopital-saint-joseph.fr

Reçu le 22 juin 2015

Résumé – La vitrification ovocytaire existe en France depuis son autorisation légale de juillet 2011 lors de la dernière révision des lois de bioéthique. Attendue depuis 30 ans, la conservation du gamète féminin aura un impact majeur sur les pratiques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) dans le monde et dans notre pays. Elle va changer tous les domaines de la biologie de la reproduction humaine, de l'AMP intra-conjugale pour infertilité au don de gamète, en passant par l'autoconservation pour préservation de la fertilité. Bien qu'apparaissant comme « évidente », la proposition de vitrification ovocytaire semble avoir du mal à intégrer les pratiques des centres de fécondation *in vitro* dans notre pays. Nous reviendrons sur les étapes qui ont abouti à cette situation. Nous aborderons également les bénéfices attendus notamment comme alternative à la congélation embryonnaire.

Mots clés : Ovocyte vitrification / AMP / don / préservation de la fertilité / FIV

Abstract – Ovocyte vitrification: a tool for the future.

Ovocyte vitrification was finally authorized by the new law voted in July 2011 upon the revision of the French bioethics law. Expected for 30 years, cryopreservation of female gametes had a major impact on Assisted Reproductive Technologies (ART) practice worldwide and in our country. It brought tremendous changes in the field of reproductive biology, from intraconjugal infertility management to gamete donation, through autologous cryopreservation for fertility preservation. Although it appears to be "obvious", ovocyte vitrification seems to be barely used as a routine technique in French IVF laboratories. We will discuss the events that led to the present situation. We will also tackle the expected benefits of ovocyte vitrification especially as an alternative to embryo freezing.

Key words: Ovocyte vitrification / ART / donation / fertility preservation

Le contexte

La congélation des gamètes a depuis longtemps motivé la recherche scientifique en raison des enjeux biologiques et de leurs applications possibles. La congélation spermatique est opérationnelle depuis plusieurs décennies chez de nombreuses espèces et fait l'objet d'utilisations en élevage. La conservation de la semence trouve sa place dans l'amélioration des performances, que ce soit pour l'amélioration des

taux de reproduction dans l'élevage ou la conservation de reproducteurs d'exception. Chez l'Homme, ces aspects ne sont que peu mis en avant mais la création de banques de sperme a connu une période florissante au début de la médicalisation de la fertilité humaine. La maîtrise de la fécondation *in vitro* (FIV) et de la culture embryonnaire ainsi que sa congélation ont également pris place dans de nombreuses activités de reproduction animale et a trouvé son heure de gloire chez l'Homme avec le succès de

Robert Edwards et Patrick Steptoe lors de la naissance de Louise Brown. La première naissance issue du transfert d'embryon congelé arrive cinq ans après les travaux d'Alan Trounson sur le sujet (Trounson & Mohr, 1983). L'ovocyte, en raison de ses qualités cytologiques particulières, tant nucléaires que cytoplasmiques, n'a pas pu être congelé aussi facilement et de ce fait sa conservation n'a pas pu trouver de place dans l'arsenal technique des biologistes de la reproduction. Toute l'organisation des techniques de laboratoire et des applications pratiques n'a été pensée qu'autour de l'embryon. Dans l'espèce humaine, dès le début des années 80 et après la naissance d'Amandine, la congélation de l'embryon précoce au stade 4/8 cellules s'est imposée comme standard de conservation. Les résultats restent décevants quand on les compare à ceux obtenus en transferts frais et bien loin d'être homogènes selon les centres. L'ovocyte congelé par méthode lente a fait une brève apparition dans les publications (Chen, 1986), tombant dans les oubliettes en raison de l'absence de reproductibilité des résultats. La congélation ultra-rapide des ovocytes ou vitrification a relancé le débat et transforme aujourd'hui nos pratiques.

Les avancées techniques de la congélation

La conservation après congélation qui respecte la spécificité des cellules après réchauffement fait partie des outils de la cryobiologie dont les bénéfices sont nombreux en reproduction humaine. Elle s'est développée dès les années 70 pour les spermatozoïdes, laissant place aux inséminations avec tiers donneur permettant aux hommes azospermiques par exemple d'accéder à la paternité. La congélation du spermatozoïde, du fait de sa faible quantité de cytoplasme et de la condensation de son ADN, est techniquement simple. Elle est d'ailleurs dès le départ une vitrification qui s'ignore puisqu'il n'y avait pas de contrôle effectif de pente de descente thermique. Il suffit de placer les spermatozoïdes dans une solution contenant un mélange de cryoprotecteurs, de stabiliser l'effet de ceux-ci à basse température avant de plonger la paillette dans l'azote liquide.

La congélation de l'embryon s'est naturellement développée peu de temps après les débuts de la fécondation *in vitro*. Elle s'est orientée sur une technique de congélation de l'embryon précoce majoritairement aux stades 4/8 cellules. Cette technique comporte trois pentes distinctes, dont l'une, faible, est responsable du qualificatif de congélation lente, pour amener les cellules à la température de stockage (Testart *et al.*, 1987). Parallèlement, la technique est automatisée pour pouvoir programmer cette pente faible de 0,3°C/mn : on imagine mal cette précision atteinte autrement. En réalité, la descente thermique

lente maîtrisée entraîne une déshydratation majeure des cellules de l'embryon qui, à la condition que la cristallisation n'altère pas les membranes, assure là encore une vitrification finale. Les écueils sont objectivés par la survie moyenne des embryons et une perte de viabilité de 50 % portant en moyenne à 12,2 % d'accouchements contre 19,6 % avec des embryons frais selon le rapport de l'Agence de la BioMédecine de 2012, limitant la place de la cryobiologie à un rôle de seconde chance. Il n'est pas rare que les couples souhaitent une nouvelle tentative avant l'utilisation des embryons congelés au prétexte que les chances sont moindres. En France, la loi interdit cette pratique et exige que tous les embryons conservés pour un couple aient été réchauffés avant toute nouvelle tentative de fécondation. La congélation lente trouve davantage ses limites lorsqu'elle est appliquée au blastocyste. La collection liquidienne du blastocœle et les échanges d'eau trans-cellulaires représentent un obstacle à une bonne congélation et favorisent le risque de cristallisation ; certains auteurs ont même proposé de réaliser une brèche dans le trophoctoderme pour limiter les destructions cellulaires (Vanderzwalmen *et al.*, 2007). Les taux de grossesses obtenus après réchauffement viennent confirmer la mauvaise survie des blastocystes après congélation lente et réchauffement.

Les premiers pas en congélation ovocytaire (Chen, 1986) n'ont pas réussi à franchir le cap de l'exploit ponctuel et malgré l'envie de vaincre les difficultés techniques, il faudra attendre le paradoxe de la loi 40 italienne et son interdiction de congélation embryonnaire pour relancer les équipes d'AMP et les chercheurs dans la course à la congélation du gamète féminin. Des améliorations apportées à la congélation lente préparent le transfert de technologie vers la vitrification en modifiant notamment les cryoprotecteurs et en augmentant leurs concentrations.

De quels ovocytes parle-t-on ?

Un bref survol de la maturation du gamète féminin est indispensable pour comprendre que tout ovocyte n'est pas forcément bon à vitrifier. Les ovogonies, après une phase intense de multiplication, s'engagent dans la méiose pendant la vie intra-utérine. Le noyau commence la première division pour se bloquer rapidement en fin de prophase I. Le pic de LH déclenche la reprise de cette première division et aboutit à un ovocyte haploïde bloqué en métaphase II qui attend la fécondation pour expulser le second globe polaire. Cette reprise de la méiose aura lieu tout au long des cycles menstruels tant qu'ils seront ovulatoires, de la puberté à la ménopause. En parallèle à cette maturation nucléaire, s'opère une maturation tout aussi complexe du cytoplasme. De la Vésicule Germinative en prophase I de division

méiotique à la métaphase II, l'ensemble des organelles intracellulaires se transforment qualitativement mais aussi quantitativement. Certaines transformations concernent la membrane qui devient plus fluide en raison de modification lipidiques, le réticulum lisse est très largement majoritaire, le réticulum rugueux ayant disparu, les mitochondries se concentrent en périphérie en grand nombre, le Golgi disparaît ... toutes ces transformations s'opèrent avec un doublement de volume que l'ovocyte ne peut réaliser qu'avec la collaboration des cellules du cumulus grâce à des expansions cytoplasmiques transzonales (*Transzonal cytoplasmic projection*). La cellule mature capable de permettre le développement préimplantatoire est issue du follicule de de Graaf. En routine en AMP, le traitement hormonal des patientes conduit à l'obtention d'une dizaine d'ovocytes en moyenne, dont 80 à 85 % de cellules matures. Seul cet ovocyte mature peut être conservé en préservant des aptitudes qui lui assurent de supporter le développement préimplantatoire; l'ovocyte immature ne possédant pas les qualités qui lui confèreraient une résistance suffisante pour être utilisé en thérapeutique humaine dans le cadre de la cryobiologie, il peut, tout au plus, dans certains cas, être mûri *in vitro* et vitrifié secondairement.

Développement de la technique de vitrification

Avec les travaux de Rall et Fahy (Fahy *et al.*, 1984; Rall & Fahy, 1985), on assiste à l'émergence de la congélation ultrarapide ou vitrification. Elle assure une congélation sans cristallisation de l'eau intracellulaire. Les premiers succès sont rapportés en termes de survie embryonnaire, de reprise de développement jusqu'au stade de blastocyste puis de naissance de portées chez la souris. L'ovocyte se prête beaucoup plus difficilement à la congélation en raison de ses caractéristiques labiles tant au plan nucléaire que cytoplasmique. Il faut attendre 1999 pour qu'une première naissance chez l'Homme soit publiée par l'équipe de Trounson (Kuleshova *et al.*, 1999) qui avait déjà publié la première grossesse après congélation embryonnaire en 1984. On notera que près de 15 ans séparent ces deux événements, laps de temps durant lequel de grands changements cliniques et biologiques ont pris place en AMP. Les progrès de la stimulation ovarienne contrôlée, et les avancées de l'imagerie avec les prélèvements ovocytaires écho-guidés ont contribué à augmenter le nombre moyen d'ovocytes recueillis pour une tentative de Fécondation *In Vitro*. De même la mise en place des micromanipulations dans le milieu des années 90 avec l'*IntraCytoplasmic Sperm Injection* (ICSI) a révolutionné les possibilités de fécondation de l'ovocyte mature dénudé de sa corona radiata. Sans ces avancées parallèles, la congélation du gamète féminin

n'aurait pas réellement de sens. Le développement de la méthode de vitrification a nécessité des mises au point plus longues que celles de la congélation lente. Deux approches sont proposées : le système ouvert avec contact direct entre l'objet à refroidir et l'azote liquide et le système fermé sans contact direct. Les vitesses de refroidissement atteignent plusieurs milliers de degrés/minute en système ouvert contre plusieurs centaines pour le système fermé. La barrière thermo-isolante qui augmente l'inertie thermique en système fermé ralentit par 10 les vitesses, ce qui convient aux embryons mais n'est pas suffisamment performant pour l'ovocyte. Les deux méthodes utilisent le réchauffement ultrarapide dont l'efficacité a été adoptée y compris en congélation lente en raison de sa faisabilité. Il doit associer une vitesse instantanée de retour à la température ambiante et une élimination des cryoprotecteurs avant de rétablir un fonctionnement cellulaire superposable à celui existant avant congélation. Cette étape est ménagée par l'utilisation de sucrose à forte concentration pour contrecarrer l'effet osmotique de sortie des cryoprotecteurs qui fragilise les membranes. C'est ce stade qui conditionne la bonne survie des cellules.

Entre 2005 (Kuwayama *et al.*, 2005) et 2008 apparaissent des dispositifs techniques adaptés qui ont rendu possible le déploiement de la technique en routine dans les laboratoires d'AMP.

Les limites au déploiement de la vitrification ovocytaire

Alors qu'il semble naturel de proposer la congélation du gamète féminin en AMP, la mise en place de la vitrification ovocytaire peine à intégrer la proposition thérapeutique des centres d'AMP en France. Les raisons de ce retard sont multiples en dehors du contexte général déjà énoncé dont nous pouvons brièvement rappeler les grandes lignes. L'absence de résultats avec l'ovocyte avait dissuadé les équipes d'intégrer la congélation ovocytaire à la proposition thérapeutique, par conséquent tous les embryons obtenus et non transférés étaient et sont toujours congelés si leur morphologie est jugée compatible avec des chances raisonnables de survie. La maîtrise de cette congélation embryonnaire l'a rendue incontournable y compris lorsqu'elle ne répond pas réellement aux besoins comme en préservation de fertilité, l'affaire Evans en étant la démonstration (*European Court of Human Rights*, 2006).

Le scepticisme

Ce fut sûrement la première raison du retard d'application de la méthode en France : la congélation

ovocytaire avait failli pendant trop longtemps pour être crédible dès les premiers résultats. Même aujourd'hui, il reste fréquent de rencontrer des leaders d'opinion en AMP qui « se posent encore des questions » (Boyer *et al.*, 2009). Il suffit de relire les arguments des experts qui avaient été opposés lors de la demande d'évaluation de la méthode en 2008 : « le laboratoire n'est pas connu pour ses travaux de recherche sur le sujet... », « si ça marchait ça se saurait... et ça marche en congélation lente! ». Même le niveau accordé en *Evidence Based Medicine* (Cobo *et al.*, 2011) reste controversé par de nombreux responsables français. Certains entretiennent une confusion sur l'attente d'un décret qui ne concerne que l'autoconservation dans le cadre du don offrant la possibilité aux femmes donneuses de conserver une partie de leurs ovocytes à des fins personnelles. Ce décret ne concerne ni l'Assistance Médicale à la Procréation ni les autoconservations réalisées lors des tentatives d'AMP intraconjugale.

Les difficultés techniques

La qualité de la méthode repose sur une maîtrise des micromanipulations, accessible facilement à des praticiens habitués à la pratique de l'AMP. Il faut reconnaître que cette expertise n'a été rendue possible que grâce aux chercheurs scientifiques qui ont inventé et fabriqué les outils qu'ils utilisaient en micromanipulation et grâce à leur maîtrise incontestée des connaissances fondamentales de l'environnement biologique. Le passage de la recherche à son application en routine impose un partage de compétences avec la communauté scientifique et la validation de nouveaux outils pour qu'ils soient ensuite mis à disposition par des industriels. En France, ce relais est d'autant plus difficile à mettre en place que les scientifiques ont été écartés des laboratoires d'AMP depuis le dernier décret fixant les compétences des biologistes exerçant dans la spécialité.

Les craintes

Aujourd'hui, les systèmes ouverts sont les seuls à permettre des vitesses de descente et de remontée thermiques suffisamment rapides pour assurer une survie optimale aux ovocytes avec une efficacité clinique de niveau A en *Evidence Based Medicine*. Les nombreuses études randomisées publiées en attestent. Il reste que certains experts agitent le spectre du risque potentiel de contamination microbiologique. Il n'est pas impossible que l'implication de ces mêmes experts dans le développement de systèmes fermés puisse représenter des conflits d'intérêts. L'argumentaire repose sur une interprétation de la directive 2006/86/CE de la Commission Européenne du 24 octobre 2006 concernant

certaines exigences techniques relatives à la codification, à la transformation, à la conservation, au stockage et à la distribution des tissus et cellules d'origine humaine.

Cette directive précise entre autres que « *la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules d'origine humaine destinés à des applications humaines, ainsi que des produits préparés à partir de tissus et cellules d'origine humaine et destinés à des applications humaines* » soient effectués, « *de manière à assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine.* ». Par ailleurs, lors de la « transformation » des cellules ou tissus, « *Les procédés critiques de transformation doivent être validés et ne peuvent rendre les tissus ou cellules cliniquement inefficaces ou nocifs pour le receveur. Cette validation peut reposer sur des études réalisées par l'établissement lui-même ou sur des données provenant d'études publiées ou, pour les procédés de transformation utilisés depuis longtemps, sur une évaluation rétrospective des résultats cliniques relatifs aux tissus fournis par l'établissement* ».

La directive précise également qu'« *avant d'opérer un quelconque changement significatif dans la transformation, il y a lieu de valider et de documenter le procédé modifié* ». Actuellement aucun système fermé n'a pu apporter le niveau de preuve d'équivalence avec les systèmes ouverts pour la vitrification de l'ovocyte (Vajta *et al.*, 2015). De nombreux travaux démontrent que le risque reste théorique (Bielanski *et al.*, 2003; Cobo *et al.*, 2012) et que le principe de précaution appliqué sans discernement ouvre la porte à un argumentaire uniquement basé sur des craintes (Germain & Girardon, 1996; Vanderzwalmen *et al.*, 2011).

La maîtrise des coûts

Toute nouvelle technique mise en place nécessite un investissement financier. Les coûts de recherche et de formation doivent être intégrés lors du passage à une utilisation plus large. La diffusion de la technique nécessite des contrôles de qualité de fabrication, de mise à disposition de l'utilisateur qui s'intègrent dans le processus de l'industrialisation et ses bonnes pratiques. Dans un parcours de soins en France, les frais financiers sont en général supportés par une cotation à la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale puisque les actes en santé tendent vers une gratuité pour le bénéficiaire. À l'heure actuelle, la congélation ovocytaire ne bénéficie d'aucune cotation auprès de l'assurance maladie, alors que le législateur compte sur cette alternative pour limiter le nombre d'embryons stockés. Gageons que la diffusion de la méthode et la concurrence pour le matériel aboutira à une charge financière raisonnable qui permettra à l'administration

de se prononcer sur une modification de la nomenclature des actes réclamée par les professionnels.

Les débuts en France en AMP intraconjugale (hors don d'ovocyte)

Les restrictions législatives à la recherche sur l'embryon (et par extension à l'ovocyte) dans notre pays ont rendu impossible l'innovation technique à l'intérieur de nos frontières et il a fallu attendre les publications internationales apportant des résultats probants pour que le législateur décide d'inscrire cette pratique dans la loi de bioéthique afin d'en permettre l'utilisation par les équipes d'AMP. Une fois convaincu du bien fondé de la démarche, il faut valider la méthode en interne et habilitier l'équipe. Dans certaines situations, les complications de la stimulation ovarienne contre-indiquent le transfert d'embryon sur le cycle stimulé, la vitrification d'une grande partie de la cohorte ovocytaire le jour de la ponction représente alors une bonne alternative à la conservation embryonnaire. C'est dans cette indication que nous avons obtenu la validation méthodologique d'étude et de mise en pratique par un Comité de Protection des Personnes qui se prêtent aux recherches biomédicales (3 Avril 2008, référence 208 R06). L'étude avait permis d'inclure 87 femmes dans un délai de 9 mois, assurant un effectif suffisant pour l'évaluation interne (Boyer *et al.*, 2014).

Résultats de la vitrification ovocytaire

La supériorité de la vitrification sur la congélation lente est apportée par l'étude de Smith (Smith *et al.*, 2010) et confirmée par le registre italien (Setti *et al.*, 2014). Rienzi (Rienzi *et al.*, 2010) montre des résultats comparables entre l'utilisation d'ovocytes frais et celle d'ovocytes vitrifiés en AMP. Dans le cadre du don d'ovocyte, Ana Cobo a conduit un essai de non infériorité (Cobo *et al.*, 2008, 2010). Enfin, l'ASRM recommande l'utilisation de la vitrification ovocytaire en préservation de la fertilité féminine sur des preuves de niveau A apportées par une démarche en « *Evidence Based Medicine* » (ASRM, 2013).

Les données publiées en 2013 (Boyer *et al.*, 2013, 2014) de la seule et unique validation française de la technique de vitrification ovocytaire étaient particulièrement encourageantes puisqu'elles montraient un taux de survie des ovocytes de 80,5 % *vs.* 90 % et plus en don et des taux de fécondation et de grossesse par transfert au moins égaux à ceux obtenus avec des ovocytes frais issus de la même cohorte. La maîtrise de la technique permet d'améliorer les taux de survie des ovocytes réchauffés à 86 %. Trois ans après la mise en

place de la vitrification ovocytaire au quotidien dans notre centre, le taux de naissances vivantes par ponction s'élève à 33 % et 50 enfants sont d'ores et déjà nés de cette nouvelle approche (données non publiées).

Appropriation par les équipes soignantes

Une fois la validation de méthode actée en interne, il est indispensable d'intégrer la nouvelle proposition thérapeutique à la prise en charge proposée par l'équipe. La conservation de l'ovocyte est facilement acceptée par les couples et est vécue comme un nouvel espoir dans un environnement éthique adapté à leurs attentes. Les contraintes pour la femme liées à la préparation de la muqueuse utérine pour les cycles de réchauffement sont minimales et contribuent à l'acceptabilité de la méthode.

Pour une équipe qui pratique de l'ordre de 700 à 800 cycles de FIV, l'activité de congélation d'ovocytes atteint rapidement 250 cycles supplémentaires annuels et les réchauffements environ 200 cycles annuels, ce qui représente une augmentation d'activité non négligeable pour l'ensemble de l'équipe et plus particulièrement pour l'équipe biologique. Il est indispensable de coordonner l'activité clinico-biologique pour éviter les pics qui s'avèrent difficiles à accepter à tous les niveaux, micromanipulations, gestion clinique des cycles de réchauffement et transferts embryonnaires supplémentaires. Le rôle crucial du coordinateur est d'harmoniser la programmation des cycles avec recueil et des cycles où l'on réchauffe des ovocytes. La cryobiologie représente plus de 50 % de l'activité du laboratoire si l'on englobe les vitrifications ovocytaires et leurs réchauffements avec la congélation embryonnaire qui reste un complément indispensable dans la prise en charge en AMP.

Déploiement en routine

Le plus grand bénéfice de la vitrification est sans aucun doute la possibilité de conserver le gamète féminin. Cette conservation remet en question la gestion de la prise en charge dans tous les secteurs de l'AMP : intraconjugale, don et préservation de la fertilité. Les équipes françaises qui proposent la vitrification ovocytaire dans le cadre de la prise en charge en AMP intraconjugale sont encore peu nombreuses bien que l'équivalence de résultats entre ovocyte frais ou vitrifié soit récemment démontrée, y compris dans la stratégie naissante du « *freeze all* » ou congélation embryonnaire de tous les embryons obtenus qui est proposée pour synchroniser le transfert de l'embryon sur une muqueuse utérine spécialement préparée à distance de l'hyperstimulation.

Des travaux récents sur l'intérêt de différer le transfert embryonnaire du cycle stimulé en dehors des cas de survenue de complication conduisent certaines équipes à opter pour la stratégie du « *freeze all* ». Il s'agit là d'un vrai challenge pour l'implantation de la vitrification ovocytaire et la maîtrise du nombre d'embryons conservés, les résultats montrant qu'il n'y a pas de différence de taux de grossesses si l'on préserve des ovocytes ou des blastocystes (Herreo-Grassa *et al.*, 2014).

L'ovocyte immature peut également être vitrifié, notamment au sein du cortex ovarien, mais les difficultés sont liées à la maturation *in vitro* qui reste encore du domaine de la recherche.

Diffusion en dehors de l'AMP intraconjugale

Préservation de la fertilité

Depuis que la vitrification ovocytaire a fait son apparition, les équipes soignantes ont enfin un outil performant pour proposer une préservation de la fertilité féminine prometteuse (Porcu *et al.*, 2008; Noyes *et al.*, 2009; Anderson *et al.*, 2011). La contrainte principale est liée à l'âge de la patiente, celle-ci doit être pubère et posséder une réserve ovarienne suffisante. Au-delà de 38 ans, la qualité des ovocytes diminue fortement ainsi que les chances de grossesse qui, dans le cas particulier, seront en plus différées du temps jugé utile de rémission/guérison de la pathologie initiale. C'est dans le cadre de cette préservation de la fertilité que les sociétés savantes ont récemment plébiscité la vitrification ovocytaire en système ouvert (ASRM, 2013) avec un bénéfice représenté par l'absence de risque de réintroduction secondaire de la pathologie. Si la question de la préservation est cruciale et souvent envisagée dans un cadre oncologique d'urgence en raison du traitement initial à instaurer, la conservation des ovocytes peut également trouver sa place dans de nombreuses pathologies bénignes dont le traitement altère également la fertilité. On retrouvera les pathologies ovariennes bénignes comme les kystes récidivants, l'endométriome dont la chirurgie entraîne très fréquemment une altération rapide de la réserve ovarienne, les pathologies génétiques comme les syndromes de Turner dont le pronostic de fertilité est très réservé et aboutit à des insuffisances ovariennes prématurées sévères et plus largement, les pathologies dont les traitements ou l'évolution elle-même peuvent conduire à une insuffisance ovarienne prématurée. Il s'agit là d'un véritable enjeu « égalitaire » avec la préservation de la fertilité masculine.

La vitrification ovocytaire ôte toute légitimité à la congélation embryonnaire proposée dans ce même cadre il y a quelques années (*European Court*, 2006).

Don d'ovocyte

La vitrification ovocytaire occupera une place importante dans la gestion du don d'ovocyte sur le modèle français. L'anonymat et la gratuité liés à la pratique des dons d'organes et de tissus seront plus facilement respectés et la carence actuelle de donneuses peut trouver là une issue favorable si les centres de FIV qui pratiquent la vitrification ovocytaire participent à l'effort commun en cédant les ovocytes que certaines patientes souhaiteront donner. Les avantages sont nombreux : pas de traitement risqué pour les donneuses, ce qui apporte un gain secondaire sur le coût de la collecte, pas de souci de conservation autologue telle que prévue par la loi de 2011 puisqu'elle aura déjà été réalisée, participation à l'effort partagé par l'ensemble des centres à la réduction du nombre de donneuses nécessaires. Le don d'ovocyte reste dans l'impasse depuis sa création en raison de la pénurie de donneuses alors que de nombreuses patientes jeunes qui ont recours à l'ICSI pour infertilité de leur conjoint accepteront probablement de céder quelques ovocytes dès lors que leur projet parental sera achevé. On apportera ici une solution au don. Il faut se rappeler que la loi européenne demande aux pays membres d'assurer les besoins de santé de leur population, il est intéressant de souligner que dans ce cadre, la France ne répond pas à la demande actuelle et se doit de contribuer financièrement à la prise en charge à l'extérieur des frontières (Boyer, 2010).

La préservation autologue pour raison non médicale

On touche à un aspect sujet à controverses ayant abouti à des prises de positions quasi dogmatiques d'instances médicales ou non médicales. Il est vrai que la vitrification ovocytaire a remis sur le devant de la scène une possibilité de différer volontairement (ou non, absence de partenaire par exemple) la survenue d'une grossesse.

Il y a au moins un aspect éthique qui doit être pris en considération, c'est le risque accepté par les jeunes donneuses pour des raisons financières essentiellement. Ce risque pourrait être supporté par la femme demandeuse de préservation pour elle-même.

La demande n'est probablement pas aussi importante que l'imaginaire collectif voudrait bien nous le faire croire. Il faut réfléchir à ne pas traiter réalité et fiction sur le même plan au risque d'agiter des dérives alors que les bénéfices n'ont pas été évalués et actés.

Conclusion

La vitrification ovocytaire émerge dans les nouvelles pratiques d'AMP. Son développement, son

déploiement sont en passe d'intégrer les routines des centres français. Ces mêmes centres sont aujourd'hui confrontés à des freins en raison d'une conjoncture économique et humaine qui empêche les équipes de se consacrer à la maîtrise technique. Mais dès demain, la demande des patientes, de la société civile et des cliniciens des centres aura raison de la frilosité actuelle. Au-delà des aspects pratiques, il est question d'éthique du soin puisqu'il s'agit d'une alternative à la congélation embryonnaire et d'une vraie chance de diminuer le nombre d'embryons stockés.

Références

- Agence de la Biomédecine (2012). Rapport médical et scientifique de l'assistance médicale à la procréation et de la génétique humaines en France Année 2012.
- Anderson, R.A., and Wallace, W.H. (2011). Fertility preservation in girls and young women. *Clin Endocrinol*, 75, 409–419.
- ASRM (2013). Mature ovocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril*, 99, 37–43.
- Bielanski, A., Bergeron, H., Lau, P., and Devenish, J. (2003). Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 46, 146–152.
- Boyer, P., Gervoise-Boyer, M., Tourame, P., Poirot, C., and Le Coz, P. (2009). Information sur une nouvelle technique : la vitrification des ovocytes. *Bull Acad Natl Méd*, 193, 1113–1125.
- Boyer, P., Tourame, P., and Le Coz, P. (2010). New assisted reproduction techniques: France, an absent subscriber. *Gynecol Obstet Fertil*, 38, 561–562.
- Boyer, P., Montjean, D., Tourame, P., and Gervoise-Boyer, M. (2013). Apport de la vitrification ovocytaire dans un laboratoire d'AMP. Vitrification des ovocytes: l'âge mûr. *Gynecol Obstet Fertil*, 41, 551–553.
- Boyer, P., Montjean, D., Tourame, P., and Gervoise-Boyer, M. (2014). Validation de la technique de vitrification ovocytaire. *Gynecol Obstet*, 16, 120–123.
- Chen, C. (1986). Pregnancy after human ovocyte cryopreservation. *The Lancet*, 327, 884–886.
- Cobo, A., Kuwayama, M., Perez, S., Ruiz, A., Pellicer, A., and Remohi, J. (2008). Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor ovocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*, 89, 1657–1664.
- Cobo, A., Meseguer, M., Remohí, J., Pellicer, A. (2010). Use of cryo-banked ovocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod*, 25, 2239–2246.
- Cobo, A., and Diaz, C. (2011). Clinical application of ovocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*, 96, 277–285.
- Cobo, A., Beliver, J., de los Santos, M.J., and Remohi, J. (2012). Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of ovocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing *in vitro* fertilisation cycles. *Fertil Steril*, 98, 1138–1146.
- European Court of Human Rights, Fourth Section, Case of Evans vs. The United Kingdom, Application no. 63339/05, 7 mars 2006, § 65.
- Fahy, G., MacFarlane, D., Angell, C., and Meryman, H. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407–426.
- Germain, J.P., and Girardon, P. (1996). Filtration stérilisante de l'Azote liquide. *Ind Alim Agr*, 113, 745–748.
- Herrero-Grassa, L., Marin, S., Barragan, M. Cobo, A., Campos, F., and Garcia-Velsaco, J. (2014). Ovocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study. *Reprod Biomed Online*, 29, 567–572.
- Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., and Trounson, A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human ovocytes: case report. *Hum Reprod*, 14, 3077–3079.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., and Leibo, S.P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human ovocytes. *Reprod Biomed Online*, 11, 300–308.
- LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique article L. 2141-1.
- Noyes, N., Knopman, J.M., Melzer, K., Fino, M.E., Friedman, B., and Westphal, L.M. (2011). Ovocyte cryopreservation as a fertility preservation measure for cancer patients. *Reprod Biomed Online*, 23, 323–333.
- Porcu, E., Bazzocchi, A., Notarangelo, L., Paradisi, R., Landolfo, C., and Venturoli, S. (2008). Human ovocyte cryopreservation in infertility and oncology review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 15, 529–535.
- Rall, W., and Fahy, G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313, 573.
- Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E., Sapienza, F., Colamaria, S., and Ubaldi, F. (2010). Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II ovocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-ovocyte study. *Hum Reprod*, 25, 66–73.
- Setti, P., Porcu, E., Patrizio, P., Vigilano, V., De Luca, R., d'Aloja, P., Spoletini, R., and Scaravelli, G. (2014). Human ovocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry Data 2007–2011. *Fertil Steril*, 102, 90–95.
- Smith, G., Serafini, P., Fiovaranti, J., Yadid, I., Coslovsky, M., Hassun, P., Alegretti, J., and Motta, E. (2010). Prospective randomized comparison of human ovocyte

- cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril*, 94, 2088–2095.
- Testart, J., Lassalle, B., Forman, R., Gazengel, A., Belaisch-Allart, J., Hazout, A., Rainhorn, J.D., and Frydman, R. (1987). Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an *in vitro* fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril*, 48, 107–112.
- Trounson, A., and Mohr, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305, 707–709.
- Vajta, G., Rienzi, L., and Ubaldi, F. (2015). Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*, 30, 325–333.
- Vanderzwalmen, P., Ebner, T., and Zech, N. (2007). One decade of experience with vitrification of human embryos in straws, hemi-straws and high security vitrification straws. *In: Vitrification in Assisted Reproduction, a user's Manual and Trouble - Shooting Guide*. INFORMA Healthcare, Edit, London, pp. 195–217.
- Vanderzwalmen, P., Ectors, F., Prapas, Y., Zech, M., Janero, D., Lejeune, B., Vanderzwalmen, S., Wirleitner, B., Zech, N., and Grobet, L. (2011). Cryopréservation d'ovocytes et d'embryons par congélation lente ou vitrification dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation. *In: Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. Springer-Verlag France, Paris, pp. 567–586.