

# Quel impact de la congélation ovocytaire par vitrification sur l'épigénétique ?

**What is the impact of the oocyte cryopreservation by vitrification on the epigenetic regulation?**

Julie Barberet<sup>1</sup>  
 Fatima Barry<sup>1</sup>  
 Céline Bruno<sup>1</sup>  
 Magali Guilleman<sup>1</sup>  
 Nicolas Lieury<sup>1</sup>  
 Cécile Choux<sup>2</sup>  
 Paul Sagot<sup>2</sup>  
 Patricia Fauque<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CHU Dijon Bourgogne, laboratoire de biologie de la reproduction, Cecos, Dijon, France

<patricia.fauque@chu-dijon.fr>

<sup>2</sup> CHU Dijon Bourgogne, gynécologie-obstétrique, Dijon, France

**Résumé.** Les enfants conçus par les technologies d'assistance médicale à la procréation (AMP) ont un risque modéré de présenter un certain nombre d'effets indésirables et de pathologies. Il n'est toujours pas établi si ce risque supplémentaire est associé à des procédures spécifiques utilisées en AMP ou aux facteurs biologiques intrinsèques rattachés à l'infertilité. L'une des principales hypothèses est que les procédures de laboratoire pourraient avoir une action sur l'épigénome des gamètes et de l'embryon. Cette suspicion est liée au fait que les procédures d'AMP interviennent précisément pendant la période où de grands remaniements se produisent au niveau de l'organisation de cet épigénome. Cet article présente les travaux qui ont étudié l'impact de la congélation ovocytaire par vitrification sur la régulation épigénétique.

**Mots clés :** congélation, épigénome, ovocyte, vitrification

**Abstract.** Children conceived by assisted reproductive technologies (ART) have an increased risk of adverse effects and diseases. It is still unresolved whether the ART procedures or infertility/subfertility status of the parents might explained some of these changes. The hypothesis is that ART procedures themselves can induce adverse epigenetic effects, especially because they take place at times when maximal epigenetic reprogramming is occurring, including during female gametogenesis and after fertilization. In this manuscript we will present the main results of the studies assessing the epigenetic impact after oocyte vitrification.

**Key words:** cryopreservation, epigenome, oocyte, vitrification

Depuis leur introduction, les techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) ont permis la naissance de millions d'enfants chez des couples infertiles, représentant en tout 2 à 6 % des naissances en Europe [1, 2]. Bien que les procédures employées soient généralement reconnues sans risque, des associations existent entre l'AMP et une incidence accrue de petits poids de naissance, de malformations congénitales, de troubles de la croissance et du métabolisme ainsi que des retards de développement psychomoteur ou mental [3].

Plus spécifiquement, il a été rapporté une augmentation du nombre de cas de pathologies rares liées à l'empreinte génomique, telles que les syndromes de Beckwith-Wiedemann (BWS), d'Angelman et de Silver-Russel (SRS) [4]. L'AMP pourrait être préjudiciable à la reprogrammation épigénétique des gamètes et de

l'embryon préimplantatoire, induisant des effets après la naissance. Les périodes de péri-conception et gamétogenèse, de fécondation et de développement embryonnaire précoce sont effectivement soumises physiologiquement à une reprogrammation épigénétique intense.

À l'échelle mondiale, la cryoconservation d'ovocytes est largement utilisée. Elle est principalement employée dans le cadre de la préservation de la fertilité, chez des femmes devant subir un traitement potentiellement stérilisant ou dont la fertilité risque d'être prématurément altérée, mais aussi dans le contexte du don d'ovocytes, et dans certains pays où la loi interdit la cryoconservation d'embryon.

La cryoconservation des ovocytes par la congélation dite lente a été initiée dans les années 1980 et la première naissance a été obtenue au Japon il y a maintenant plus de trente

Médecine  
de la **Reproduction**

Tirés à part : P. Fauque

doi : 10.1684/mte.2019.0764

ans [5]. Un inconvénient majeur de cette technique est que les taux de survie ovocytaire sont restés extrêmement faibles. L'apparition de la vitrification ovocytaire a depuis complètement révolutionné ce domaine.

La vitrification est un processus physique au cours duquel un liquide passe à un état solide, dit vitreux, sans formation de cristaux de glace. De nombreuses études ont maintenant démontré que les taux de survie ovocytaire, de fécondation et de clivage embryonnaire après emploi de cette technique de vitrification étaient supérieurs à ceux obtenus après congélation lente, et pourraient même être équivalents à ceux obtenus avec les ovocytes non cryoconservés [6-13].

Avec la naissance de très nombreux enfants de par le monde et devant l'absence d'anomalies à la naissance de ces enfants conçus après l'utilisation de la vitrification ovocytaire [14-16], cette technique a été autorisée en France en 2011 (loi du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique). Elle est maintenant considérée par de nombreux pays comme la technique de première intention pour préserver la fertilité des femmes [17]. La vitrification ovocytaire connaît également un essor dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation (AMP) intraconjugale, souvent utilisée en cas d'échecs de recueil de sperme mais aussi pour préférer la conservation des ovocytes à celle des embryons dans certaines situations [18]. De plus, l'évolution de nos sociétés pourrait conduire, dans un futur très proche, à étendre les indications vers une congélation des ovocytes pour des raisons dites « sociétales ».

*Il apparaît ainsi important que la technique de congélation des ovocytes ne soit pas délétère et cela pour les futures grossesses qui pourront être obtenues à partir de ces ovocytes.*

Cependant, les issues de grossesse lors de l'utilisation de cette technique demeurent encore très hétérogènes entre les centres, les techniques utilisées et les opérateurs, nécessitant une longue courbe d'apprentissage et ne permettant pas de dépasser un taux de survie de 70-80 % [10].

De plus, il a été rapporté chez les mammifères que la vitrification ovocytaire pourrait diminuer de manière significative le potentiel de développement des ovocytes [19-21].

Les effets de la vitrification pourraient toutefois se situer au niveau moléculaire et impacter la régulation épigénétique, d'autant plus que c'est au cours de l'ovogenèse que d'importantes modifications épigénétiques ont lieu.

Cet article présente l'état des connaissances quant à l'impact de la congélation par vitrification sur la régulation épigénétique, après une description des marques épigénétiques contrôlant la transcription des gènes ainsi que des grands événements épigénétiques qui ont lieu au cours de la gamétogenèse.

## Modifications épigénétiques au cours de l'ovogenèse

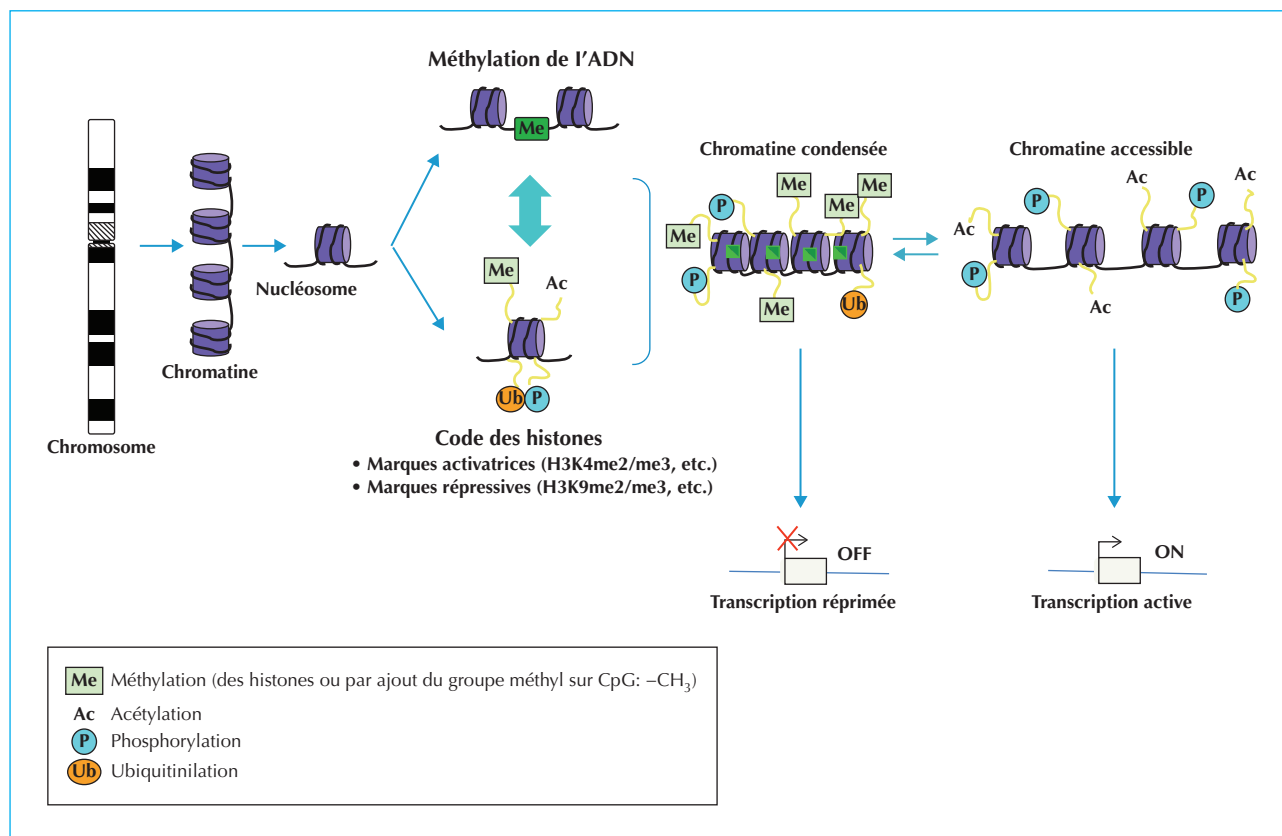
L'« épigénétique » regroupe tous les processus conduisant à la diversification de l'expression du matériel génétique, de manière héritable au cours des divisions cellulaires, sans impliquer de modifications des séquences nucléotidiques concernées. Ces processus, mis en place au cours du développement, sont nombreux et complexes, et ils influencent, directement ou indirectement, la structure de la chromatine. La méthylation de l'ADN apparaît comme une marque épigénétique majeure, faisant intervenir une modification covalente de l'ADN (méthylation en position 5' des cytosines des dinucléotides CpG). Elle contribue au contrôle de l'activité génique, de manière coordonnée avec l'ensemble des modifications biochimiques post-traductionnelles de l'histone, connu sous le nom de « code des histones » (figure 1).

Les marques épigénétiques sont en outre impliquées dans la régulation fine d'un petit groupe de gènes dits « soumis à empreinte » (environ 150 décrits chez la souris et l'Homme ; <http://www.har.mrc.ac.uk>). Ces gènes présentent en effet une expression monoallélique dépendante de l'origine parentale de l'allèle. L'empreinte parentale est liée à un marquage épigénétique différentiel des allèles parentaux, établi au cours de la gamétogenèse. Les gamètes matures transmettent ensuite l'épigénotype parental qui sera maintenu au cours des divisions cellulaires successives après fécondation. Ce phénomène concerne différentes régions et joue un rôle majeur dans le développement et la croissance du fœtus.

### La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN exerce, de manière globale, un rôle répressif sur l'activité génique et la transcription (figure 1). Elle constitue également l'un des mécanismes majeurs de l'initiation et du maintien de l'empreinte parentale ; elle est présente dans des régions dites différenciellement méthylées (DMR, pour *differentially methylated regions*), riches en dinucléotides CpG. Ces gènes soumis à empreinte sont généralement regroupés en *loci*, où chacun possède des DMR. Au sein de ces DMR, des régions de contrôle de l'empreinte (ICR, pour *imprinting control regions*) participent à la régulation des autres gènes soumis à empreinte au sein du même locus.

Grâce au développement récent de technologies permettant d'analyser de manière globale l'épigénotype à partir de peu de cellules, les grands événements épigénétiques (dont l'étude s'est longtemps basée sur les données obtenues dans le modèle murin) ont pu être décryptés chez l'Homme, en particulier ceux rattachés à la méthylation de l'ADN [22, 23]. En résumé, les cellules germinales primordiales (PGC, pour *primordial germ cells*) subissent, dès les premières semaines du développement,



**Figure 1.** Représentation schématique des marques épigénétiques impliquées dans le contrôle transcriptionnel. La double hélice d'ADN s'enroule autour des histones pour former les nucléosomes, les unités fondamentales de la chromatine. Le code épigénétique correspond à des modifications biochimiques ciblant la molécule d'ADN (ajout d'un groupement méthyl sur les cytosines incorporées dans la molécule d'ADN), ou les protéines histones, en particulier leurs extrémités aminoterminales qui sortent librement du nucléosome. Ce code épigénétique va modifier l'état de compaction de la chromatine (condensée ou accessible) et en conséquence l'activité génique (transcription réprimée ou active).

une déméthylation importante de leur génome. La reméthylation gamétique sera ensuite différente selon le sexe. En effet, chez l'homme, la méthylation *de novo* des cellules germinales est initiée et quasi achevée au cours du développement prénatal, quand chez la femme, les ovocytes restent hypométhylés pendant toute la période fœtale, la méthylation de l'ADN n'étant acquise qu'en période post-pubertaire, au cours de chaque cycle, dans chaque lot d'ovocytes engagés vers l'ovulation.

Le fait que ce marquage soit établi progressivement, tout au long de la croissance ovocytaire, attire l'attention quant aux possibles dérégulations induites par les techniques d'AMP – en particulier la stimulation hormonale plurifolliculaire – mais aussi, potentiellement, par la manipulation des ovocytes nécessaire dans le protocole de congélation ovocytaire [24]. Il est intéressant de préciser que les patients atteints d'un syndrome de Beckwith-Wiedemann et nés après AMP présentent tous une altération de la méthylation portée par l'allèle maternel [25].

Le génome embryonnaire est également extensivement reprogrammé (déméthylé) au cours du développement préimplantatoire. Toutefois, la méthylation de l'ADN acquise dans la lignée germinale au niveau des centres d'empreinte est maintenue après la fécondation, afin d'assurer l'expression monoallélique et sexe-spécifique. La reméthylation du génome apparaît ensuite dans les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste.

### Les marques d'histones

Les modifications post-traductionnelles des histones représentent un système de contrôle transcriptionnel beaucoup plus complexe, combinant plus de soixante-dix sites de modification biochimique et quelques centaines de protéines catalysant l'ajout ou le retrait de ces modifications. Les histones sont en effet des protéines associées à l'ADN qui permettent la compaction de l'ADN et l'organisation tridimensionnelle de la chromatine (l'unité structurale de la chromatine est le nucléosome,

composé d'un octamère d'histones [quatre histones, chacune en deux exemplaires : H2A, H2B, H3 et H4] sur lequel s'enroulent 147 pb d'ADN). C'est au niveau des extrémités terminales (ou queues) des histones que ces modifications enzymatiques post-traductionnelles vont intervenir (figure 1). Chaque modification biochimique est associée à un état de compaction particulier de la chromatine ; de manière générale, l'acétylation des résidus lysines (K) indique un état actif, tandis que la méthylation des lysines et des arginines (R) peut avoir un effet activateur ou répresseur suivant leur position. À titre d'exemple, les marques de méthylation sur les lysines 9 et 27 de l'extrémité de l'histone H3 (soit H3K9 et H3K27) sont répressives, quand la marque de méthylation en H3K4 est activatrice.

## Impact de la vitrification ovocytaire

### Sur les niveaux de méthylation de l'ADN

Chez l'humain, seules trois études ont été réalisées, dont deux par technique d'immunofluorescence, globale et basée sur la détection du groupement méthyl sur les cytosines (tableau 1) [26-28]. Une étude a analysé les conséquences de la vitrification ovocytaire sur les niveaux de méthylation au stade embryonnaire [27], tandis que les deux autres ont analysé l'impact de la vitrification au stade de vésicule germinative, sur les ovocytes maturés *in vitro*.

En synthèse, aucune différence n'a été rapportée chez l'humain (tableau 1).

Les études réalisées chez l'animal – principalement les modèles bovins et murins (tableau 2) –, ont appliqué des techniques d'analyses variées, soit sur les ovocytes, soit sur les embryons, et en ciblant des catégories de gènes très différentes. Aussi ne permettent-elles pas d'établir de

conclusions fermes sur l'impact épigénétique de la vitrification ovocytaire.

Deux études chez les bovins rapportent une diminution de la méthylation globale par immunofluorescence après vitrification ovocytaire [29, 30], tandis que l'analyse ciblée sur trois gènes soumis à empreinte ne met pas en évidence de différence significative [31].

L'analyse de la méthylation de l'ADN réalisée par de Zhao *et al.*, portant sur les enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques, n'a mis en évidence aucune différence [32]. Enfin, l'analyse des niveaux de méthylation des promoteurs de gènes de pluripotence montre un impact de la vitrification ovocytaire (tableau 2) [33].

Au stade de blastocyste issu d'ovocyte vitrifié, une diminution des niveaux de méthylation pourrait s'observer [29, 31]. Cette diminution semble prédominante au sein du trophoctoderme [29].

### Sur les modifications des histones

Ces analyses ont été menées uniquement chez l'animal (tableau 2). Les résultats sont là aussi complexes à interpréter. En effet, différentes modifications d'histones ont été étudiées. Toutefois, il semble que la vitrification entraîne une augmentation des niveaux d'acétylation des histones (H4 et H3) [34-36]. Il est à noter que l'inverse a été observé au niveau du trophoctoderme [29]. Concernant les niveaux de méthylation de l'histone H3K9, les résultats rapportés apparaissent également discordants (tableau 2).

## Discussion

Chez l'homme, il est difficile d'établir des conclusions devant le faible nombre d'études. Les résultats sont en

Tableau 1. Impact de la vitrification ovocytaire sur la méthylation de l'ADN, chez l'humain

Références	Matériels	Nombre d'ovocytes/embryons	Technique d'analyse	Séquences étudiées	Conclusions
Liu <i>et al.</i> , 2017 [26]	MII, MII issus de MIV, VG vitrifiées	56 <i>in vivo</i> -MII, 106 MII après MIV, 122 MII issus de VG vitrifiées	Immunofluorescence (5mC)	Niveau global	Pas de différences significatives sur les intensités de fluorescence entre les trois groupes d'ovocytes
De Munck <i>et al.</i> , 2015 [27]	MII issus de dons d'ovocytes, partage des cohortes	31 embryons (J3) issus de 17 MII frais et 14 MII vitrifiés	Immunofluorescence (5mC, 5hmC)	Niveau global	Pas de différences significatives sur les intensités de fluorescence entre les embryons issus d'ovocytes frais et vitrifiés (5mC : 1,0 ± 0,49 vs 0,83 ± 0,41 ; 5hmC : 1,0 ± 0,40 vs 0,81 ± 0,36)
Al-Khtib <i>et al.</i> , 2011 [28]	MII issus de MIV (VG données à la recherche)	77 MII après MIV issus de 184 VG vitrifiées, et 85 MII issus de 120 VG frais	Pyroséquençage	<i>H19</i> (pool de 3 ovocytes) et <i>KCNQ1OT1</i>	La vitrification des ovocytes au stade de VG n'affecte pas le profil de méthylation de <i>H19</i> -DMR et <i>KvDMR1</i> des ovocytes MIV

MIV = maturation *in vitro* ; MII = ovocyte au stade de métaphase II, VG = vésicule germinative

Tableau 2. Impact de la vitrification ovocytaire sur la méthylation de l'ADN et modifications d'histones, chez l'animal

Références	Modèle animal	Matériels	Nombre d'ovocytes	Nombre d'embryons	Technique d'analyse	Séquences étudiées	Conclusions
Chen <i>et al.</i> , 2016 [29]	Bovin	MII frais ou vitrifiés ou embryons (J2-J8) issus de MII frais ou vitrifiés après MIV	10-15 ovocytes ou embryons par condition		Immunofluorescence	5mC, H3K9ac, H3K9me3	Diminution des niveaux de méthylation de l'ADN et de H3K9me3 et augmentation de H3K9ac pour les ovocytes MII vitrifiés Aucune différence au niveau de la MCI Diminution du niveau de méthylation de l'ADN et de H3K9ac dans le TE après vitrification des ovocytes
Cheng <i>et al.</i> , 2014 [31]	Murin	Blastocystes (J4) issus de MII frais ou vitrifiés		30-45 blastocystes par condition	Traitement au bisulfite + séquençage	<i>H19</i> , <i>Peg3</i> , <i>Snrpn</i>	Pas de différences significatives au niveau des ovocytes Diminution des niveaux de méthylation de l'ADN pour <i>H19</i> , <i>Peg3</i> , et <i>Snrpn</i> dans les blastocystes après vitrification des ovocytes
Zhao <i>et al.</i> , 2013 [32]	Murin	MII frais ou vitrifiés	100 ovocytes par condition		Traitement au bisulfite + séquençage	<i>Dnmt1o</i> , <i>Hat1</i> , promoteur de <i>Hdac1</i>	Pas de différences significatives
Hu <i>et al.</i> , 2012 [30]	Bovin	MII issus de MIV, frais ou vitrifiés	150 ovocytes par condition		Immunofluorescence	Niveau global	Diminution des niveaux de méthylation après congélation lente des ovocytes ou après utilisation du DMSO Augmentation des niveaux de méthylation après utilisation du PROH
Spinaci <i>et al.</i> , 2012 [34]	Porcin	MII issus de MIV, frais ou vitrifiés	H4K5ac : 282 ovocytes frais, 192 ovocytes vitrifiés ; H3K9me : 98 ovocytes frais, 121 ovocytes vitrifiés		Immunofluorescence	H3K9 méthylation et H4K5 acétylation	Augmentation du niveau de H4ac et modification significative des niveaux de H3K9me2 (diminution ou augmentation) après vitrification ovocytaire
Milroy <i>et al.</i> , 2011 [33]	Murin	MII frais maturés <i>in vivo</i> , MII frais après MIV, MII après MIV de VG vitrifiés	200 ovocytes par condition		Traitement au bisulfite + séquençage	Pomoteurs des gènes de pluripotence <i>Oct4</i> , <i>Nanog</i> , <i>Foxd3</i> , <i>Sox2</i>	Augmentation des niveaux de méthylation des promoteurs de <i>Oct4</i> (25 %) et de <i>Sox2</i> (4,5 %) après vitrification des ovocytes maturés <i>in vitro</i> par comparaison avec les MII frais maturés <i>in vivo</i>
Yan <i>et al.</i> , 2010 [36]	Murin	MII	66 frais, 70 vitrifiés		Immunofluorescence	H3K9me, H4K5ac	Augmentation des niveaux de H3K9me et H4K5ac après vitrification ovocytaire
Suo <i>et al.</i> , 2010 [35]	Murin	MII	78 ovocytes au minimum par condition		Immunofluorescence	H4K12ac	Augmentation des niveaux de H4K12ac après vitrification ovocytaire Les zygotes issus des MII vitrifiés présentent des niveaux perturbés avant et après formation des pronoyaux

J = jour de culture embryonnaire, MIV = maturation *in vitro* ; MII = ovocyte au stade de métaphase II, MCI = masse cellulaire interne, TE = trophoctoderme



autres basés soit sur des techniques présentant une faible résolution d'analyse (immunofluorescence), soit à partir de seulement deux gènes soumis à empreinte.

Chez l'animal, en revanche, la vitrification ovocytaire pourrait, d'une part, modifier les profils de méthylation de l'ADN de manière globale, sans réel effet négatif sur l'empreinte, et d'autre part impacter les modifications biochimiques d'histones.

Ces changements épigénétiques pourraient expliquer les modifications expressionnelles observées dans la littérature, à savoir une *down-regulation* globale de l'expression (modèle bovin) [37], et plus particulièrement des gènes impliqués dans la synthèse de l'ATP (modèle bovin) [38, 39] et l'ubiquitination (chez l'Homme) [40].

Les auteurs rapportent également des modifications au niveau des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire [37] ainsi qu'une *up-regulation* des gènes impliqués dans le stress oxydatif (modèle murin) [41] et l'apoptose (modèle bovin) [21].

## Conclusion

Cette revue de la littérature met en évidence la nécessité d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes de régulation potentiellement impactés par le procédé de vitrification-réchauffement des ovocytes, qui reste très peu étudié chez l'humain. Cette amélioration des connaissances est maintenant rendue possible par l'utilisation des nouvelles technologies permettant une analyse à grande échelle de la méthylation de l'ADN (méthylome) et de la transcription (transcriptome), à partir d'une faible quantité de matériel (à l'échelle d'une seule cellule [single-cell]).

**Liens d'intérêt :** Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. European IVFmC, European Society of Human Reproduction, Embryology *et al.* Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2017 ; 32 : 1957-73.
2. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, *et al.* ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 2018 ; 33 : 1586-601.
3. Hart R, Norman RJ. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I—General health outcomes. *Hum Reprod Update* 2013 ; 19 : 232-43.
4. Vermeiden JP, Bernardus RE. Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril* 2013 ; 99 : 642-51.
5. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986 ; 1 : 884-6.
6. Cai LB, Qian XQ, Wang W, *et al.* Oocyte vitrification technology has made egg-sharing donation easier in China. *Reprod Biomed Online* 2012 ; 24 : 186-90.
7. Cobo A, Kuwayama M, Perez S, *et al.* Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008 ; 89 : 1657-64.
8. Oktay K, Oktem O. Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of an ongoing experience. *Fertil Steril* 2010 ; 93 : 762-8.
9. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, *et al.* Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011 ; 23 : 505-12.
10. Potdar N, Gelbaya TA, Nardo LG. Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2014 ; 29 : 159-76.
11. Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, *et al.* Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod* 2012 ; 27 : 1606-12.
12. Sole M, Santalo J, Boada M, *et al.* How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013 ; 28 : 2087-92.
13. Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 1996-2000.
14. Cobo A, Serra V, Garrido N, *et al.* Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertil Steril* 2014 ; 102 : 1006-15.
15. Martinez M, Rabadan S, Domingo J, *et al.* Obstetric outcome after oocyte vitrification and warming for fertility preservation in women with cancer. *Reprod Biomed Online* 2014 ; 29 : 722-8.
16. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006 ; 86 : 70-80.
17. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Coello A, *et al.* Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016 ; 105 : 755-64.
18. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011 ; 96 : 277-85.
19. Kohaya N, Fujiwara K, Ito J, Kashiwazaki N. Generation of live offspring from vitrified mouse oocytes of C57BL/6J strain. *PLoS One* 2013 ; 8 : e58063.
20. Phongnimitr T, Liang Y, Sritrattana K, *et al.* Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim Sci J* 2013 ; 84 : 719-25.
21. Zhao XM, Hao HS, Du WH, *et al.* Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *J Pineal Res* 2016 ; 60 : 132-41.
22. Guo F, Yan L, Guo H, *et al.* The Transcriptome and DNA Methylation Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell* 2015 ; 161 : 1437-52.

- 23.** Guo H, Zhu P, Yan L, *et al.* The DNA méthylation landscape of human early embryos. *Nature* 2014 ; 511 : 606-10.
- 24.** Fauque P. Ovulation induction and epigenetic anomalies. *Fertil Steril* 2013 ; 99 : 616-23.
- 25.** Fauque P, Jouannet P, Jammes H. Parental imprinting related to assisted reproductive technologies. *Gynecol Obstet Fertil* 2008 ; 36 : 1139-46.
- 26.** Liu MH, Zhou WH, Chu DP, *et al.* Ultrastructural changes and methylation of human oocytes vitrified at the germinal vesicle stage and matured *in vitro* after thawing. *Gynecol Obstet Invest* 2017 ; 82 : 252-61.
- 27.** De Munck N, Petrusa L, Verheyen G, *et al.* Chromosomal meiotic segregation, embryonic developmental kinetics and DNA (hydroxy) méthylation analysis consolidate the safety of human oocyte vitrification. *Mol Hum Reprod* 2015 ; 21 : 535-44.
- 28.** Al-Khtib M, Perret A, Khoueiry R, *et al.* Vitrification at the germinal vesicle stage does not affect the méthylation profile of H19 and KCNQ1OT1 imprinting centers in human oocytes subsequently matured *in vitro*. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 1955-60.
- 29.** Chen H, Zhang L, Deng T, *et al.* Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology* 2016 ; 86 : 868-78.
- 30.** Hu W, Marchesi D, Qiao J, *et al.* Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. *Fertil Steril* 2012 ; 98 : 752-60.
- 31.** Cheng KR, Fu XW, Zhang RN, *et al.* Effect of oocyte vitrification on deoxyribonucleic acid méthylation of H19, Peg3, and Snrpn differentially methylated regions in mouse blastocysts. *Fertil Steril* 2014 ; 102 : 1183-90.
- 32.** Zhao XM, Ren JJ, Du WH, *et al.* Effect of vitrification on promoter CpG island méthylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 1 $\alpha$ , histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 2013 ; 100 : 256-61.
- 33.** Milroy C, Liu L, Hammoud S, *et al.* Differential methylation of pluripotency gene promoters in *in vitro* matured and vitrified, *in vivo*-matured mouse oocytes. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 2094-9.
- 34.** Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, *et al.* Vitrification of pig oocytes induces changes in histone H4 acétylation and histone H3 lysine 9 méthylation (H3K9). *Vet Res Commun* 2012 ; 36 : 165-71.
- 35.** Suo L, Meng Q, Pei Y, *et al.* Effect of cryopreservation on acétylation patterns of lysine 12 of histone H4 (acH4K12) in mouse oocytes and zygotes. *J Assist Reprod Genet* 2010 ; 27 : 735-41.
- 36.** Yan LY, Yan J, Qiao J, *et al.* Effects of oocyte vitrification on histone modifications. *Reprod Fertil Dev* 2010 ; 22 : 920-5.
- 37.** Wang N, Li CY, Zhu HB, *et al.* Effect of vitrification on the mRNA transcriptome of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2017 ; 52 : 531-41.
- 38.** Zhao XM, Du WH, Wang D, *et al.* Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended *in vitro* culture. *Mol Reprod Dev* 2011 ; 78 : 942-50.
- 39.** Zhao XM, Du WH, Wang D, *et al.* Effect of cyclosporine pretreatment on mitochondrial function in vitrified bovine mature oocytes. *Fertil Steril* 2011 ; 95 : 2786-8.
- 40.** Monzo C, Haouzi D, Roman K, *et al.* Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2012 ; 27 : 2160-8.
- 41.** Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, *et al.* Gene expression profiles and *in vitro* development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 2006 ; 73 : 700-8.