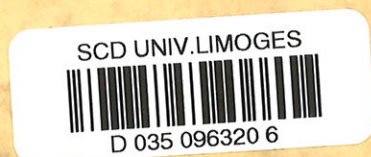


UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE



Année 2001



Thèse n° 173/1

**CRYOPRESERVATION DU TISSU OVARIEN :
TECHNIQUES, INDICATIONS**

THESE

pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2001

par

Jean-François DECAY

né le 15 juillet 1964 à Brive-la-Gaillarde (Corrèze)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur H-J. PHILIPPE

Président

Madame le Professeur D. BORDESSOULE

Juge

Monsieur le Professeur P. CLAVERE

Juge

Madame le Professeur E. VIDAL

Juge

Monsieur le Docteur Y. AUBARD

Membre invité

Monsieur le Docteur J-P. POUGET

Membre invité

Monsieur le Docteur F. RAFFI

Membre invité

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE



Année 2001

Thèse n° 173.

**CRYOPRESERVATION DU TISSU OVARIEN :
TECHNIQUES, INDICATIONS**

THESE

pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2001

par

Jean-François DECAY

né le 15 juillet 1964 à Brive-la-Gaillarde (Corrèze)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur H-J. PHILIPPE

Président

Madame le Professeur D. BORDESSOULE

Juge

Monsieur le Professeur P. CLAVERE

Juge

Madame le Professeur E. VIDAL

Juge

Monsieur le Docteur Y. AUBARD

Membre invité

Monsieur le Docteur J-P. POUGET

Membre invité

Monsieur le Docteur F. RAFFI

Membre invité

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE**

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis
Monsieur le Professeur COGNE Michel

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

| | |
|---------------------------------------|--|
| ACHARD Jean-Michel | PHYSIOLOGIE |
| ADENIS Jean-Paul * (C.S) | OPHTALMOLOGIE |
| ALAIN Jean-Luc (C.S) | CHIRURGIE INFANTILE |
| ALDIGIER Jean-Claude | NEPHROLOGIE |
| ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S) | MEDECINE INTERNE |
| ARNAUD Jean-Paul (C.S) | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| BARTHE Dominique | HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE |
| BEDANE Christophe | DERMATOLOGIE |
| BERTIN Philippe | THERAPEUTIQUE |
| BESSEDE Jean-Pierre | OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE |
| BONNAUD François (C.S) | PNEUMOLOGIE |
| BONNETBLANC Jean-Marie (C.S) | DERMATOLOGIE |
| BORDESSOULE Dominique (C.S) | HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION |
| BOUTROS-TONI Fernand | BIOSTATISTIQUE ET INFORMATIQUE MEDICALE |
| CHARISSOUX Jean-Louis | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| CLAVERE Pierre | RADIOTHERAPIE |
| CLEMENT Jean-Pierre (C.S) | PSYCHIATRIE ADULTES |
| COGNE Michel | IMMUNOLOGIE |
| COLOMBEAU Pierre (C.S) | UROLOGIE |
| CORNU Elisabeth | CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE |
| COURATIER Philippe | NEUROLOGIE |
| CUBERTAFOND Pierre (C.S) | CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE |
| DARDE Marie-Laure (C.S) | PARASITOLOGIE |
| DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S) | PEDIATRIE |
| DENIS François (C.S) | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-HYGIENE |
| DESCOTTES Bernard (C.S) | ANATOMIE |
| DUDOGNON Pierre (C.S) | REEDUCATION FONCTIONNELLE |
| DUMAS Jean-Philippe | UROLOGIE |
| DUMAS Michel | NEUROLOGIE |
| DUMONT Daniel | MEDECINE DU TRAVAIL |
| DUPUY Jean-Paul (C.S) | RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE |
| FEISS Pierre (C.S) | ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE |
| GAINANT Alain | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| GAROUX Roger (C.S) | PEDOPSYCHIATRIE |
| GASTINNE Hervé (C.S) | REANIMATION MEDICALE |
| JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile | IMMUNOLOGIE |
| LABROUSSE François (C.S) | ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE |
| LASKAR Marc (C.S) | CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE |
| LEGER Jean-Marie | PSYCHIATRIE D'ADULTES |
| LEROUX-ROBERT Claude (C.S) | NEPHROLOGIE |
| LIENHARDT-ROUSSIE Anne | PEDIATRIE |
| MABIT Christian | ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| MARQUET Pierre | PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE |
| MAUBON Antoine | RADIOLOGIE |
| MELLONI Boris | PNEUMOLOGIE |
| MENIER Robert (C.S) | PHYSIOLOGIE |
| MERLE Louis | PHARMACOLOGIE |
| MOREAU Jean-Jacques (C.S) | NEUROCHIRURGIE |
| MOULIES Dominique | CHIRURGIE INFANTILE |
| NATHAN-DENIZOT Nathalie | ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE |

PARAF François
PHILIPPE Henri-Jean (C.S)
PILLEGAND Bernard (C.S)
PIVA Claude (C.S)
PREUX Pierre-Marie
RIGAUD Michel (C.S)
ROUSSEAU Jacques
SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)
TREVES Richard (C.S)
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel (C.S)
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S)
VERGNENEGRE Alain
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S)
WEINBRECK Pierre (C.S)

ANATOMIE PATHOLOGIQUE
 GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
 HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
 MEDECINE LEGALE
 INFORMATION MEDICALE ET EVALUATION
 BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
 RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
 MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
 HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
 OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
 RHUMATOLOGIE
 CANCEROLOGIE
 NEUROLOGIE
 ANATOMIE
 BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
 EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION
 MEDECINE INTERNE
 REANIMATION MEDICALE
 CARDIOLOGIE
 MALADIES INFECTIEUSES

PROFESSEUR ASSOCIE A MI-TEMPS

BUCHON Daniel

MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

ROCHE Doriane

Nous tenons à dédier ce travail,

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur H-J PHILIPPE

GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE,
PROFESSEUR DES UNIVERSITES,
CHEF DE SERVICE,
PRATICIEN HOSPITALIER.

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse. Votre spécialité au cœur du sujet de ce travail et vos qualités de praticien et d'enseignant donneront à vos critiques une valeur toute particulière.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde considération.

A NOS JUGES :**Madame le Professeur D. BORDESSOULE,**

HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION,
MEDECIN DES HOPITAUX,
CHEF DE SERVICE.

Nous avons pu apprécier, lors d'un stage de six mois effectué dans votre service, la qualité de votre enseignement et l'étendue de vos connaissances.

Votre dynamisme, votre très grande disponibilité avec vos patients sont pour eux source d'encouragements et de confiance.

Nous vous remercions de nous avoir aidé dans le choix de ce travail à la frontière de votre spécialité et établissant une connexion avec la discipline Gynéco-Obstétricale.

Monsieur le Professeur P. CLAVERE,

CANCEROLOGIE RADIOTHERAPIE,
PRATICIEN HOSPITALIER.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

Madame le Professeur E. VIDAL,

MEDECINE INTERNE,
CHEF DE SERVICE.

Nous avons pu apprécier la qualité de votre enseignement. Nous avons eu la chance de pouvoir suivre l'activité de votre service de Médecine Interne, stage d'externe toujours très prisé car très formateur. Nous vous remercions d'avoir bien voulu juger ce travail.

Monsieur le Docteur Y. AUBARD,

GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE,
PRATICIEN HOSPITALIER.

Merci Yves, de juger ce travail dont tu es à l'origine pour l'avoir évoqué avec moi à l'époque du choix de mon sujet de thèse.

Je reste admiratif devant l'étendue de tes recherches et de tes publications concernant ce sujet qui reste pour toi un véritable « dada ».

Tes judicieux conseils m'ont été d'une aide précieuse...

Monsieur le Docteur J-P. POUGET,

GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE,
PRATICIEN HOSPITALIER,
PRESIDENT DU CONSEIL DEPARTEMENTAL
DE L'ORDRE DES MEDECINS.

Vous continuez à nous imposer le respect et l'admiration devant la passion et le dévouement que vous manifestez pour ce métier malgré ces nombreuses années de pratique.

Monsieur le Docteur F. RAFFI,

GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE,
CHEF DE SERVICE - CHG TULLE,
PRATICIEN HOSPITALIER.

Vous nous avez appris à aimer cette spécialité au point de nous donner envie de poursuivre sur vos traces.

Nous tenterons toujours de prendre pour exemple la rigueur de votre démarche clinique associée à de grandes qualités humanistes.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A mes parents,
Sans eux rien ne serait arrivé !
Qu'ils reçoivent ici le témoignage de toute mon affection.

A Nathalie,
Pour tous les moments précieux passés à tes côtés, avec toute ma tendresse.

A Isabelle,
Pour ton soutien décisif, avec toute ma tendresse.

A toute ma famille.

Aux médecins du service de Gynécologie-Obstétrique de l'hôpital de Tulle,
En particulier, les docteurs :

J-P. BOUBY, A-M. BRUNERIE, G. DUBAYLE, J-P. POUGET, A. PRESSAC.

Travailler « à côté d'eux » a toujours été une source d'enrichissements sur les
plans humain et professionnel.

Qu'ils reçoivent ici, le témoignage de toute ma gratitude et de mon profond
respect.

Au docteur B. FALLOUH,
Qu'il reçoive ici l'expression d'une amitié sans faille.

A l'ensemble du personnel du service de Gynécologie-Obstétrique de
l'hôpital de Tulle.

A tous mes amis.
A Sylvain et Xavier.

« L'homme par ses prodigieuses techniques dépasse, semble-t-il, les cadres
de sa propre pensée »
BACHELARD (Le matérialisme rationnel, 1953).

NOTA BENE :

Nous avons utilisé, dans ce travail, quelques sigles et abréviations dans le but d'alléger le texte.

La plupart correspondent à des termes médicaux usuels.

Cependant, afin d'en faciliter la compréhension, nous dressons un lexique à la fin de cette étude, page 100.

PLAN

INTRODUCTION

I – LA TECHNIQUE DE LA CRYOPRESERVATION DE TISSU OVARIEN

Le prélèvement du tissu ovarien et son conditionnement pour la congélation

- La voie d'abord
- Le conditionnement du tissu
 - Que faut-il congeler dans l'ovaire ?
 - Le conditionnement avant congélation

La congélation et la décongélation du tissu ovarien

- Histoire de la cryopréservation du tissu ovarien
- Le cryoprotecteur
- La décongélation
- Résultats généraux de la congélation-décongélation

L'utilisation du tissu ovarien

- L'autogreffe d'ovaire
 - L'autogreffe orthotopique de tissu ovarien
 - L'autogreffe hétérotopique de tissu ovarien
- La maturation folliculaire in vitro
- La xénogreffe
 - Revue des travaux réalisés sur la xénogreffe de tissu ovarien
 - Synthèse de ces différents travaux
 - Aspects éthiques de la xénogreffe
- L'allogreffe du tissu ovarien

II- LES INDICATIONS DE LA CRYOPRESERVATION DE TISSU OVARIEN

Rappels physiologiques

- Multiplication des ovogonies
- Initiation méiotique
- Atrésie
- Folliculogénèse
- Ovulation
- Phase lutéale

A quoi pourrait servir la CPTO ?

- La destruction du stock folliculaire liée au temps
- Les situations pathologiques qui menacent le stock folliculaire
- Les menaces iatrogènes pour la réserve folliculaire

Les problèmes soulevés par la CPTO

- Le problème de l'âge
- Le problème de la quantité de tissu à collecter
- Le devoir d'information des patientes
- Les problèmes éthiques et législatifs

CONCLUSION

INTRODUCTION

La cryopréservation du tissu ovarien (CPTO) est une nouvelle méthode d'aide médicale à la procréation (AMP) dont le but est de constituer une réserve de gamètes féminins, comme la cryopréservation du sperme le permet chez l'homme. Cependant il existe une grande différence entre la CPTO et la cryopréservation du sperme : chez la femme, seuls les follicules primordiaux survivent au processus de la congélation/décongélation/greffe ; il s'agit donc du stockage de gamètes immatures et il est nécessaire, après la décongélation de ces gamètes, d'obtenir leur maturation si l'on veut parvenir à des grossesses. Ceci explique que si l'auto-conservation du sperme est un procédé classique, bien établi et qui a fait ses preuves en procréation médicalement assistée, la CPTO en est encore à ses débuts et seules quelques rares tentatives d'autogreffe ont été rapportées à ce jour dans l'espèce humaine.

Nous envisagerons dans un premier temps de faire « un état des lieux » des travaux de recherche sur la CPTO, puis nous verrons quelles indications nous pouvons déjà retenir pour cette nouvelle technique et quelles indications nous pouvons prévoir dans le futur.

1

LA TECHNIQUE

DE LA CRYOPRESERVATION

DU TISSU OVARIEN

Le prélèvement du tissu ovarien et son conditionnement pour la congélation

- ***La voie d'abord***

Dans les modèles expérimentaux, l'abord de l'ovaire a été réalisé par laparotomie médiane (mouton, singe) ou par lombotomie dans le modèle murin. Chez la femme, la coélioscopie est un moyen idéal pour prélever tout ou partie du tissu ovarien. Il est en effet possible par cette voie d'abord de prélever la quantité désirée de tissu ovarien avec un minimum d'altération de l'appareil génital. Si l'ovaire entier est prélevé, il est préférable d'éviter l'électrocoagulation à proximité du cortex qui pourrait détruire des follicules. Les pinces automatiques à autosuture rendent l'ovariectomie très simple et peu traumatisante pour le stock folliculaire. Si l'ovariectomie est partielle (prélèvement d'un demi-ovaire), il faut également éviter l'électrocoagulation pour réaliser la section gonadique, les ciseaux coélioscopiques sont préférables. L'hémostase du fragment ovarien résiduel est parfois un peu délicate, il est possible d'électrocoaguler les petits vaisseaux de la médullaire à la pince bipolaire fine et de réaliser une suture de la tranche ou un

encollage. Enfin si l'on ne désire que des biopsies de cortex ovarien, Meiorow a décrit un appareil permettant de réaliser des biopsies de 5 mm de diamètre sur 2 à 3 mm de profondeur [65], utilisable en coelioscopie après introduction par un trocart de 5 mm.

L'extraction de l'ovaire ou du fragment ovarien prélevé doit être la moins traumatisante possible. Après ensachage, une contre-incision de 2 cm est en générale suffisante pour retirer l'ovaire entier.

Un autre intérêt non négligeable de la coelioscopie est la possibilité, dès le lendemain de l'intervention si cela est nécessaire, de débiter un traitement anticancéreux. En effet, comme nous le verrons, l'une des meilleures indications actuelles de la CPTO concerne les patientes ayant à subir un traitement anticancéreux castrateur [45,67], dans ce contexte la coelioscopie permet de ne pas différer le traitement.

Enfin, la coelioscopie permet de faire un bilan de l'appareil génital de la patiente qui pourra s'avérer utile en vue d'une fertilité future. Le prélèvement ovarien coelioscopique est également parfaitement adapté à l'enfant, même très jeune.

En cas de contre-indication à la coeliochirurgie, la laparotomie reste toujours une alternative possible pour réaliser le prélèvement de tissu ovarien.

- **Le conditionnement du tissu**

- **Que faut-il congeler dans l'ovaire ?**

Les deux grandes fonctions ovariennes sont sa fonction **exocrine** (émission mensuelle du gamète femelle assurant la fertilité) et sa fonction **endocrine** (production des hormones stéroïdiennes ovariennes). Ces deux fonctions sont assurées par les follicules qui contiennent à la fois les gamètes et les cellules somatiques capables de sécréter les stéroïdes et l'inhibine. Le tissu ovarien adjacent aux follicules pourrait être abandonné s'il était possible d'isoler les follicules et ne conserver qu'eux. Carrol et al. [17] ont en effet démontré chez la souris, que la transplantation des follicules ovariens isolés permettait de préserver les deux fonctions ovariennes. Cependant, s'il est relativement simple d'isoler les follicules primordiaux de la souris par désagrégation enzymatique, la chose est beaucoup plus complexe pour le tissu ovarien humain où les follicules se trouvent dans un cortex très dense [77]. Actuellement, il est donc nécessaire de conserver le cortex ovarien adjacent aux follicules.

A l'opposé, il pourrait paraître tentant de conserver tout l'ovaire avec sa vascularisation ; la réanastomose des pédicules vasculaires après conservation permettrait alors une réoxygénation rapide du tissu. Cependant, les possibilités actuelles de la cryobiologie permettent de conserver des

cellules, voire des tissus ; mais il est encore impossible de faire survivre après congélation un organe entier et les essais de congélation d'ovaires entiers de petits animaux (rat, lapin) se sont soldés par des échecs [4]. Ceci est vraisemblablement dû à la mauvaise pénétration des cryoprotecteurs en profondeur dans l'organe.

Les meilleurs résultats sont donc obtenus avec le tissu humain en congelant le cortex ovarien soigneusement débarrassé de la médullaire. Les follicules primordiaux sont situés très superficiellement dans ce cortex dont on peut ne garder qu'un millimètre d'épaisseur. La surface optimale des fragments de cortex n'est pas déterminée avec certitude. Plusieurs auteurs ont congelé de tous petits fragments de l'ordre du mm³, mais de bons résultats ont également été rapportés avec des fragments nettement plus gros, de l'ordre de 1 cm², voire plus.

➤ **Le conditionnement avant congélation**

La période qui sépare la dévascularisation du tissu ovarien, lors du prélèvement, du moment où le tissu sera congelé, est appelée **ischémie chaude**. Cette période doit être réduite à son minimum car c'est le moment où se produisent des altérations tissulaires qui seront responsables, lors de la reperfusion, de la production de radicaux libres. Cette production de radicaux libres provoque des lésions cellulaires qui vont venir endommager

les greffons lors de la reperfusion de l'organe. Ces lois, largement démontrées en transplantation d'organes tels que le rein, le foie ou le cœur, n'ont jamais été vérifiées clairement sur le tissu ovarien. Cependant, rien ne permet de présumer que le tissu gonadique soit épargné par les dégâts liés à la production des radicaux libres [45]. Ainsi Nugent a pu démontrer qu'en ajoutant de la vitamine E (un inhibiteur des radicaux libres) dans le milieu de Liebovitz, il améliorerait la survie des follicules primordiaux au sein des greffons ovariens [71]. Il serait intéressant de tester l'efficacité d'autres inhibiteurs des radicaux libres tels que l'allopurinol, le glutathion ou la super oxyde dismutase.

Plusieurs solutés ont été utilisés : le Liebovitz [8,9,43,46,68] ; le RPMI [6] ; le PBS (phosphate buffered saline) contenant de la sérum albumine humaine [37]. Oktay utilise l'alpha minimal essential medium (alpha-MEM ; Gibco) [75]. S'il est prudent de diminuer la période d'ischémie chaude pré-congélation, il faut néanmoins trouver un compromis car il est nécessaire également de laisser le temps aux cryoprotecteurs de bien pénétrer dans le tissu ovarien que l'on veut préserver. Dans la plupart des études faites sur l'animal, la période entre le prélèvement et la congélation a été d'environ 30 min. Les seuls essais faits avec le tissu humain rapportés à ce jour [68] ont également été réalisés avec un délai de 30 min. avant la congélation. Il est préférable d'agiter les greffons ovariens dans leur milieu pour favoriser la pénétration du cryoprotecteur. Une température basse de 4°C minimise

l'ischémie chaude et les effets néfastes de certains cryoprotecteurs (DMSO) à température ambiante. Certains travaux récents sur des greffons non congelés de tissu humain, rapportent cependant de meilleurs résultats en laissant les greffons à 37°C pendant la phase d'ischémie chaude [95]. D'autres auteurs insistent sur l'étape de déshydratation du tissu avant la congélation, ainsi Gook a obtenu ses meilleurs résultats, en terme d'aspect histologique des follicules et du stroma ovarien, en réalisant une phase de déshydratation de 90 min. en une étape à l'aide de sucre [37].

La congélation et la décongélation

du tissu ovarien

• *Histoire de la cryopréservation du tissu ovarien*

La particularité de la greffe ovarienne est d'avoir été largement essayée chez la femme, avant même d'avoir fait la preuve de son efficacité chez l'animal [26]. Parmi les très nombreux auteurs qui réalisèrent des greffes ovariennes chez la femme, Tuffier [94] est celui qui publia la plus grande série en 1921. Il est le premier à avoir relaté des tentatives de préservation par le

froid de greffons ovariens chez la femme. Il rapporta 16 greffes après conservation plusieurs jours en chambre froide de ces greffons (sans plus de précision) ; il n'obtint que des échecs de greffe. A la lumière des connaissances actuelles, ces échecs n'ont rien de surprenant, en effet les processus biophysiques et biochimiques d'altération cellulaire persistent à des températures inférieures à 0°C [29]. D'autre part, de nombreuses bactéries se multiplient encore à - 8°C, malgré la congélation de l'eau intra et extra cellulaire.

Ces premiers échecs, relatés par l'un des auteurs ayant le plus travaillé sur la greffe ovarienne, ont fait condamner les tentatives de cryoconservation pour de nombreuses années. Ces échecs ne se limitèrent pas à l'ovaire et les tentatives sur d'autres organes furent également des échecs. La cryoconservation en général dut attendre les progrès dans la compréhension des mécanismes d'altérations tissulaires au froid pour revenir à l'ordre du jour.

En 1932, quelques tentatives infructueuses d'essais de conservation du tissu ovarien par le froid chez l'animal furent réalisées par Lipschutz [59] et en 1942 par Payne [84].

Les premiers travaux en matière de congélation de tissu ovarien ont débuté avec les expérimentations de l'école anglaise dans les années 1950-1960. Pendant cette décennie, quatre auteurs anglais, Parkes [79,80], Deanesly [24,25,26], Green [49] et Parrott [82,83] se sont intéressés à la congélation du tissu ovarien. Leurs travaux ont permis d'établir les principes

fondamentaux de la congélation du tissu ovarien tels qu'ils sont encore appliqués de nos jours :

- le tissu ovarien ne survit à la congélation que s'il est mis en présence d'un cryoprotecteur ; le seul disponible à l'époque était le glycérol ;

- la descente en congélation doit être lente (« slow cooling »), la courbe de descente proposée à l'époque était de 1 à 2°C par minute jusqu'à - 40°C, ensuite, la descente était beaucoup plus rapide jusqu'à la température de stockage qui était de - 140°C ;

- tous les follicules matures ou en croissance sont détruits par la congélation ;

- seuls les follicules primordiaux survivent à cette congélation, à des taux cependant faibles à l'époque (5 %) avec le glycérol comme cryoprotecteur ;

- la décongélation doit être au contraire rapide (« rapid thawing ») et la greffe réalisée immédiatement après car le tissu ovarien décongelé s'altère très vite.

Les résultats de ces travaux princeps, s'ils sont fondamentaux pour nos connaissances actuelles, semblaient montrer les limites de la congélation du tissu ovarien puisque seulement 5 % des follicules primordiaux survivaient à la congélation chez le rat selon Green [49]. Quoiqu'il en soit, ce faible taux de survie a néanmoins permis à Parrott [83] d'obtenir la première grossesse à partir de tissu ovarien congelé chez la souris en 1960.

A la fin des années 1960, et après obtention de la première grossesse avec tissu ovarien congelé, on aurait pu s'attendre à voir une explosion des travaux de recherche dans cette voie. En fait, il n'en fut rien et, au contraire, pendant plus de trente ans, aucune publication de tentative de congélation de tissu ovarien n'a été faite. Ceci peut s'expliquer par plusieurs faits : tout d'abord, la technique elle-même, si elle était fonctionnelle, n'en restait pas moins peu rentable puisque plus de 90 % des follicules étaient détruits par la congélation ; d'autre part, les indications de la congélation du tissu ovarien faisaient défaut car, si la radiothérapie et la chimiothérapie étaient déjà utilisées en oncologie, les jeunes femmes, traitées de la sorte et survivant au cancer, étaient peu nombreuses. La fertilité de ces patientes passait largement au second plan après la gravité de la maladie néoplasique dans l'esprit des soignants. Ce sont donc les progrès de la cancérologie qui ont fait renaître un intérêt pour la congélation du tissu ovarien. C'est à Gosden [43,45,46] que revient le privilège d'avoir remis à l'ordre du jour la cryopréservation du tissu ovarien essentiellement dans le but de préserver la fertilité des jeunes femmes soumises à un traitement anticancéreux.

En 1990, Gosden [43] proposait une courbe de descente en température inspirée du *slow cooling*, avec des résultats encourageants. Cette descente est faite de plusieurs paliers. Les tubes ou les paillettes contenant les greffons sont mis dans un congélateur programmable dont la température de départ se situe vers + 5°C. La descente est alors de 2 °C/min

jusqu'à - 9°C. Un seeding est alors réalisé soit manuellement soit automatiquement, puis la descente est reprise à 0,3°C/min jusqu'à - 40°C. Ensuite, la vitesse de descente en température est accélérée à 10°C/min. jusqu'à - 140°C. Les tubes sont alors retirés du congélateur et stockés dans l'azote liquide. La plupart des auteurs contemporains travaillent avec ce type de descente en température ou des courbes voisines.

Certains travaux récents ont comparé le *slow cooling* avec des procédés plus rapides de congélation (semi-rapide ou vitrification), les résultats obtenus avec ces autres protocoles étaient moins bons [37].

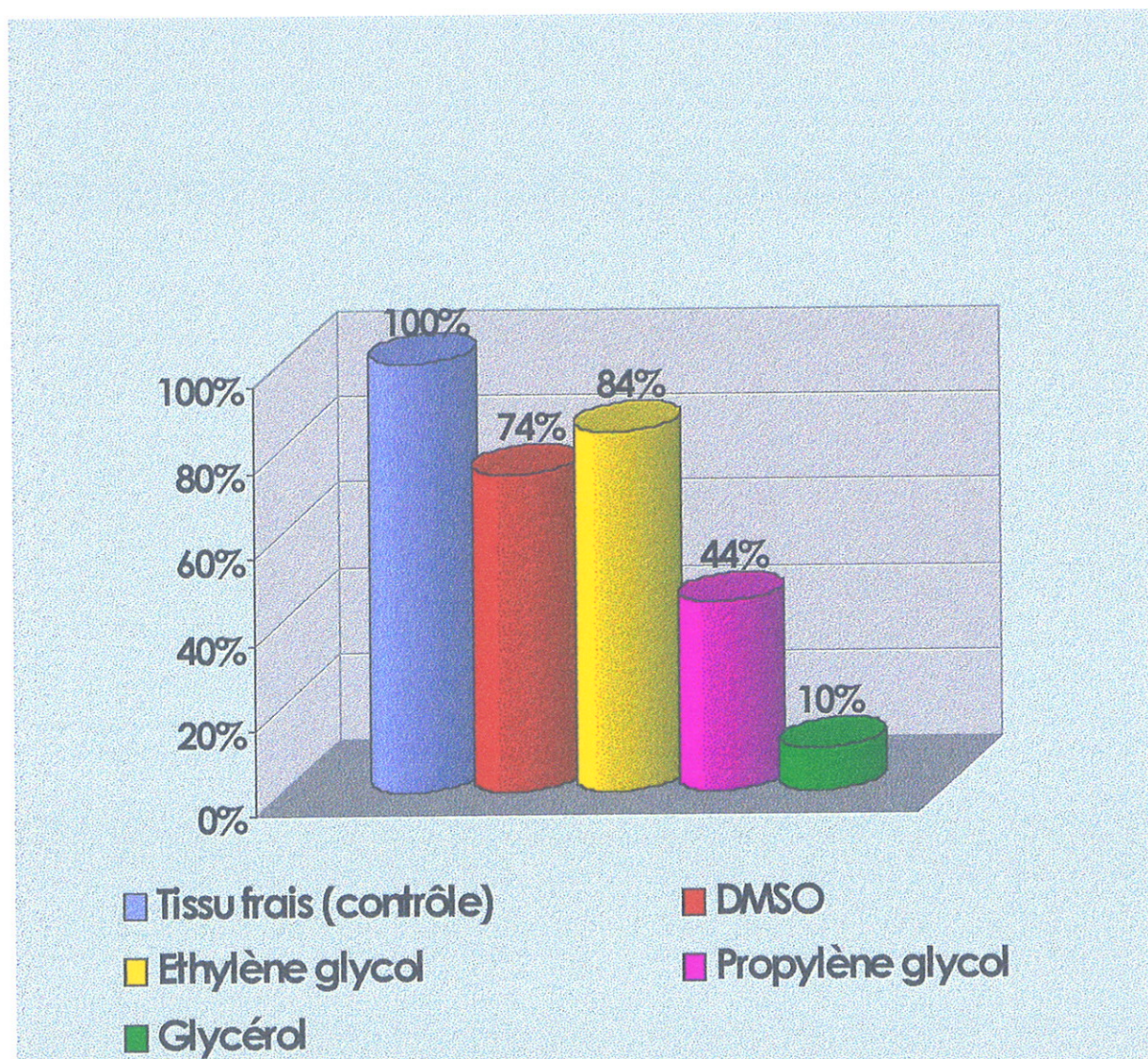
Le gold standard en matière de congélation du tissu ovarien reste donc le *slow cooling*.

• **Le cryoprotecteur**

Un autre problème de la congélation est celui du choix du cryoprotecteur. Il est en effet impossible, dans l'état de nos connaissances actuelles, de faire survivre à la congélation des cellules ou un tissu vivant en l'absence de cryoprotecteurs. Les agents cryoprotecteurs sont des produits qui permettent aux cellules de supporter les altérations liées au froid. La principale altération est la cristallisation de l'eau qui peut détruire tous les organites cellulaires. Les travaux princeps avaient été menés avec le glycérol qui était le seul cryoprotecteur disponible à l'époque. Nous avons vu que les

résultats étaient assez mauvais puisque seuls 5 % des follicules primordiaux survivaient à la congélation chez le rat [49]. Gosden a démontré que l'on pouvait très nettement améliorer la survie folliculaire chez l'animal en utilisant les cryoprotecteurs modernes tels que le DMSO [43]. Newton et al. ont testé le tissu humain avec quatre cryoprotecteurs sur un modèle de xénogreffe dans la souris *SCID* [68] (figure 1). Ils ont démontré qu'au moins les trois quarts des follicules primordiaux survivaient avec le DMSO et l'éthylène glycol. Les taux étaient un peu plus faibles sans différence significative avec le propanediol. Par contre, les taux étaient seulement de 10 % avec une différence significative pour le glycérol. On peut conclure de ces travaux que le DMSO ou l'éthylène glycol sont parfaitement adaptés à la congélation du tissu ovarien humain et que les taux de survie folliculaire à l'issue de ces recherches sont compatibles avec une application pratique. Gook et al. ont également rapporté de très bons résultats en utilisant le 1,2 propanediol comme cryoprotecteur pour le tissu humain, avec 85 % des follicules ayant un aspect normal dans les meilleures conditions de l'expérimentation [37]. Il ne s'agit néanmoins dans ce travail que d'un aspect histologique des follicules et leur valeur fonctionnelle mérite d'être confirmée par une évaluation.

Figure 1 : Pourcentage de follicules primordiaux survivants après congélation avec différents cryoprotecteurs (tissu ovarien humain greffé dans le rein de souris SCID) [68].



- ***La décongélation***

La décongélation qui est réalisée actuellement par la plupart des équipes est la même que celle proposée il y a 40 ans par l'école britannique [24,79,80,81]. C'est le « rapid thawing » : les tubes ou les paillettes sont extraits de l'azote liquide et plongés dans un bain-marie à 25°C. Dès le dégel des milieux de congélation, les fragments ovariens sont retirés et lavés dans une succession de trois bains de Liebovitz afin d'éliminer toute trace des cryoprotecteurs dont certains sont cytotoxiques à température ambiante (DMSO). Le tissu doit ensuite être utilisé rapidement.

- ***Résultats généraux de la congélation/décongélation***

Plusieurs auteurs ont démontré qu'après décongélation les follicules primordiaux survivants avaient un aspect histologique normal [37,70,89]. Il est assez difficile de chiffrer la perte en follicules primordiaux liée à la congélation, mais elle semble assez faible. Les pertes observées sont pratiquement toutes liées à la greffe du tissu ovarien.

L'utilisation du tissu ovarien

Nous avons vu que seuls les follicules primordiaux survivaient à la congélation. L'inconvénient de cet état de chose est qu'à la décongélation, les ovocytes survivants sont immatures et donc impropres à la fécondation immédiate. Une maturation folliculaire et ovocytaire est nécessaire avant la fécondation. Cette maturation folliculaire peut être réalisée en théorie selon plusieurs modalités :

- on peut greffer le tissu ovarien décongelé à la patiente. Il s'agira alors d'une **autogreffe**. La croissance folliculaire reprendra dès que le greffon sera correctement vascularisé ;

- on peut essayer d'obtenir une **maturation folliculaire in vitro** jusqu'au stade de follicules et d'ovocytes matures.

Si ces deux premiers procédés paraissent plus intéressants, il existe néanmoins d'autres possibilités pour utiliser le tissu ovarien décongelé :

- l'**allogreffe** consisterait à greffer le tissu à une autre patiente. Les lois du rejet d'allogreffe seraient alors incontournables et seuls les traitements immunosuppresseurs pourraient éviter le rejet ;

- **la xénogreffe** sur l'animal est une dernière possibilité pour utiliser le tissu ovarien décongelé. On peut prendre pour cela un animal dénué de système immunitaire qui ne ferait donc pas de rejet. Après maturation des follicules au sein de l'organisme de cet animal, on pourrait ponctionner les ovocytes matures et les utiliser pour une FIV chez la patiente.

Nous envisagerons successivement ces différents procédés en nous attardant surtout sur les deux premiers.

• **L'autogreffe d'ovaire**

La greffe de fragments ovariens est un modèle expérimental qui a fait ses preuves depuis de nombreuses années dans de multiples espèces [11]. On sait en effet qu'il n'est pas besoin d'anastomoses vasculaires pour que les greffons survivent car la néovascularisation des greffons est suffisante pour assurer la survie des follicules primordiaux et leur croissance [45,57].

Le choix du site de ces autogreffes est très important et de très nombreux sites ont été testés dans de nombreuses espèces [11]. Si l'on réimplante le tissu dans sa situation princeps (**greffe orthotopique**), on peut espérer une fertilité naturelle sans recours à d'autres méthodes d'AMP. On peut également imaginer la réimplantation dans un autre site (**greffe hétérotopique**) et le recours à la fécondation in vitro pour obtenir une grossesse.

➤ ***L'autogreffe orthotopique de tissu ovarien***

La première grossesse obtenue avec ce modèle fut celle de Parrott [83] en 1960 qui réalisa une greffe orthotopique chez la souris. Ces travaux furent repris et confirmés à une plus large échelle par la suite [43,52]. Les recherches actuelles ont permis de réaliser ce même type de greffe chez le rat et d'obtenir des grossesses [7]. Gosden et al. ont obtenu la première grossesse chez un gros animal, la brebis, avec une autogreffe orthotopique de tissu ovarien [46]. L'autogreffe, ou la greffe syngénique prend d'autant mieux que l'animal receveur est castré. Cette notion est anciennement connue, elle a été confirmée récemment par Cox et al. avec des greffes de tissu ovarien fœtal ou de souriceau nouveau-né chez des souris adultes [22]. La croissance folliculaire se bloque aux follicules pré-antraux chez les receveurs non castrés, elle se poursuit au delà si le receveur est castré.

Il est donc clair que cette technique a des chances d'être fonctionnelle dans l'espèce humaine, c'est d'ailleurs une autogreffe orthotopique qui a été réalisée par Oktay lors de la première tentative d'utilisation de tissu ovarien congelé chez la femme [73]. Le problème pratique qui se pose est celui de la réimplantation du tissu ovarien. Chez le rat et la souris, il existe, contrairement à l'espèce humaine, une bourse ovarienne qui rend l'autogreffe orthotopique très simple et qui assure une bonne vascularisation aux greffons. Gosden, chez la brebis, a amarré les fragments ovariens sur le ligament large à proximité du pavillon tubaire. Il n'a obtenu que deux

grossesses, l'une avec un greffon congelé, l'autre avec un greffon non congelé. Vingt deux mois après la greffe, ces greffons se sont avérés capables d'ovuler mais étaient très pauvres en follicules primordiaux [12].

Aubard et coll. ont tenté de reproduire cette expérience chez la brebis. Ils ont obtenu des ovulations mais une péritonisation de leurs greffons empêchait toute fécondation spontanée. De plus, la survie folliculaire s'est avérée pauvre dans les greffons (environ 10% des follicules primordiaux) [9]. De même, Salle et al. ont obtenu une péritonisation de greffons orthotopiques chez le mouton dans une première série de travaux [88,89], mais dans une seconde série, ils ont obtenu des grossesses et la naissance d'agneaux normaux. Ces résultats témoignent du caractère aléatoire de la greffe orthotopique dans les espèces dépourvues de bourse ovarienne. Ils sont néanmoins encourageants, même s'ils laissent présager des problèmes de péritonisation des greffons dans l'espèce humaine. Octal a choisi pour sa patiente de transfixier les greffons par un fil (60 greffons d' 1 mm^3 environ) et de les positionner en coelioscopie sous le feuillet postérieur du ligament large, renonçant donc ainsi d'emblée à une fertilité naturelle spontanée [73]. Les résultats en terme de survie des greffons ont été pauvres puisque la patiente six mois après sa greffe n'avait pas ovulé spontanément. Elle a toutefois répondu à une induction d'ovulation de manière correcte, mais depuis il semble qu'elle n'ovule plus. Aubard et coll. ont tenté cette technique de greffe des fragments « en chapelet » au niveau sous-cutané chez le mouton

avec de mauvais résultats (travail non publié). Ils conseillent d'utiliser des greffons plus gros, de l'ordre du cm^2 et de les amarrer bien à plat sur le site receveur pour favoriser la revascularisation rapide des follicules primordiaux [9]. C'est cette technique qui a été utilisée par Radford dans le second rapport de greffe orthotopique publié à ce jour dans l'espèce humaine [85]. Chez cette patiente, une sécrétion d'estrogènes par le greffon en dehors de toute stimulation a été observée.

➤ ***L'autogreffe hétérotopique de tissu ovarien***

Une alternative serait de réimplanter le tissu ovarien dans un autre site que sa situation originelle. Nous savons des expérimentations animales que les greffons ovariens reprennent parfaitement en de nombreux sites tels que le rein, l'espace sous cutané, la rate, sous le péritoine, la chambre antérieure de l'œil ... Si le but est d'obtenir des grossesses, il serait alors nécessaire, après maturation folliculaire, de recourir à la FIV. Gosden a ainsi obtenu des grossesses chez la souris [43]. Aubard et coll. ont réimplanté des greffons ovariens congelés, puis décongelés sous la peau du ventre chez la brebis (figure 2). Ils ont constaté que la survie folliculaire était faible (10% environ) et ont observé des ovulations spontanées chez la majorité des animaux et des maturations ovocytaires complètes après stimulation (figure 3). Ils ont obtenu des fécondations en FIV, mais les embryons ne progressèrent pas plus loin que

le stade 4 cellules ; aucun blastocyste ne fut obtenu [9]. Bien que le nombre d'ovocytes soit encore faible (une dizaine environ), la qualité de ces ovocytes et leur capacité à produire des embryons normaux doivent être explorées davantage.

Oktay a rapporté le premier cas de greffe hétérotopique dans l'espèce humaine, à la face interne du bras, il a obtenu une ovulation au sein du greffon et a ponctionné un ovocyte mature [72].

L'autogreffe de tissu ovarien est très certainement un moyen fonctionnel chez la femme pour obtenir une maturation folliculaire post-décongélation. Le choix du lieu de la greffe reste néanmoins un vrai problème. Il est nécessaire de réaliser davantage d'expérimentations animales dans des espèces dont l'anatomie ovarienne est proche de l'homme, comme le mouton, le porc ou le singe, pour pouvoir proposer un lieu de greffe sur des bases solides en application clinique humaine.

Figure 2 : Autogreffe hétérotopique de tissu ovarien chez la brebis [9].

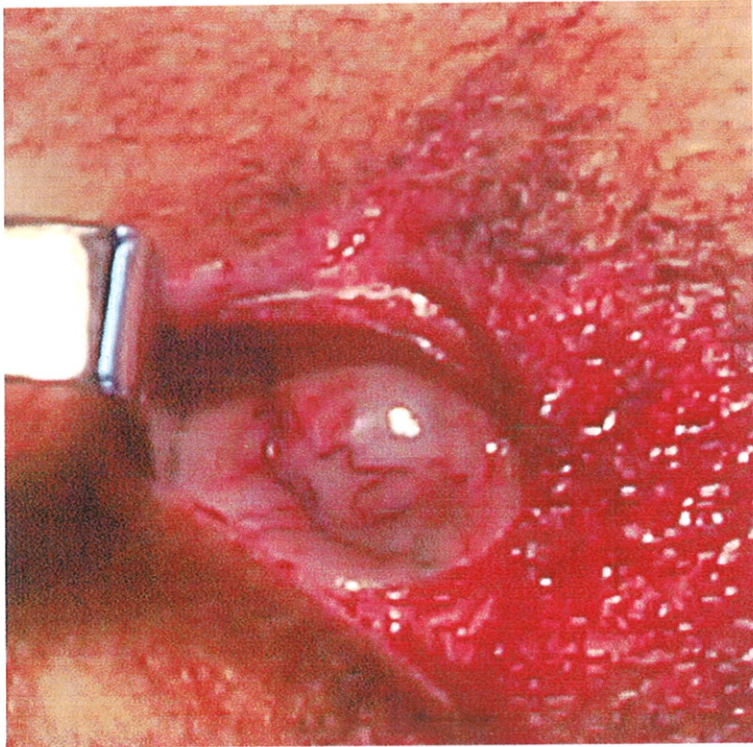
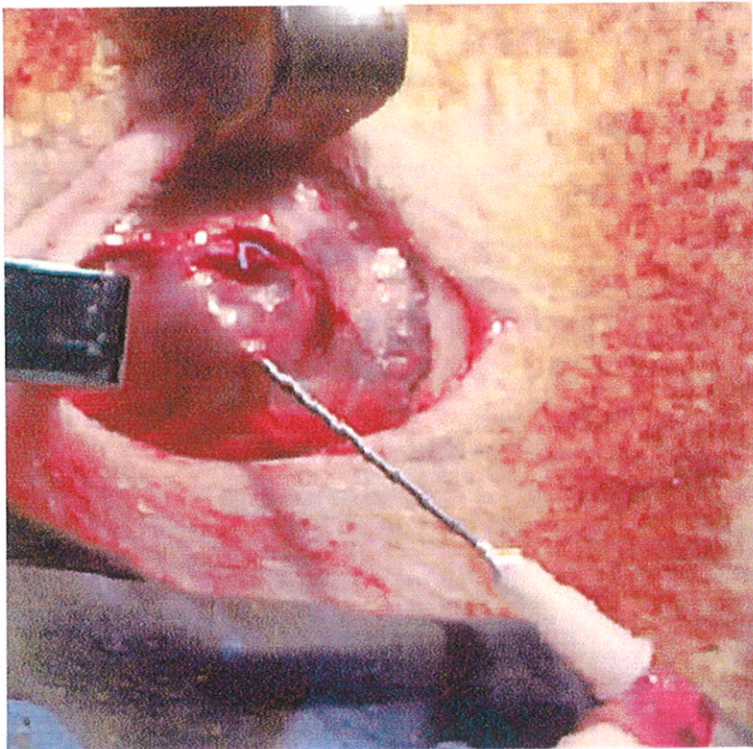


Figure 3 : Ponction de follicules après autogreffe hétérotopique de tissu ovarien chez la brebis [9].



• **La maturation folliculaire in vitro**

La maturation in vitro de follicules ovariens a pour finalité de produire des ovocytes matures, fécondables, capables d'être à l'origine d'un développement embryonnaire complet. Cette technique permettrait l'utilisation du tissu ovarien en cas de pathologies hématologiques comme les leucémies, évitant ainsi tout risque de réintroduction de la pathologie initiale [47,90]. Les techniques de culture des follicules ovariens en sont encore à leurs balbutiements . Etant donné que seuls les follicules primordiaux survivent aux techniques de congélation-décongélation, le système de culture idéal serait celui permettant le développement des follicules du stade primordial jusqu'au stade préovulatoire [24,79]. Actuellement, le développement folliculaire complet in vitro n'a pu être obtenu que chez la souris et avec un rendement extrêmement faible. En effet, 2 souriceaux ont été obtenus, dont un seul vivant, après transfert de 190 embryons à 2 cellules dans les trompes de souris pseudo-gestantes [30]. Par contre, dans le modèle murin, la culture folliculaire à partir de follicules préantraux, a permis à plusieurs équipes d'obtenir des embryons et des naissances [21,31,91]. Dans aucune autre espèce, il n'a été obtenu pour le moment de naissance après culture folliculaire in vitro.

En ce qui concerne la culture folliculaire dans l'espèce humaine, les difficultés sont liées à la longueur de la folliculogénèse [40] et à la grosseur du follicule préovulatoire qui pose d'énormes problèmes techniques. Par ailleurs,

même s'il a été montré que la présence de gonadotrophines dans les milieux de culture améliorerait le développement folliculaire [1,98], nous avons peu de connaissance par exemple, sur la régulation paracrine de la folliculogénèse. Or, ces éléments sont indispensables à une bonne croissance folliculaire et cela pose des problèmes au niveau de l'élaboration de milieux de culture adaptés à la culture folliculaire in vitro [32]. Les travaux sur la folliculogénèse in vitro dans l'espèce humaine ne sont pas très nombreux. Généralement, on utilise des systèmes de culture organotypique, qui permettent une culture en trois dimensions, conservant ainsi l'architecture folliculaire [1,13,55,87,97]. Différents stades folliculaires ont pu être cultivés in vitro avec une bonne survie folliculaire et obtention du stade folliculaire suivant. Une étape difficile dans le développement folliculaire est le passage follicule primordial au stade follicule primaire. La culture sur membrane de fragments ovariens permet d'assurer cette transition in vitro [55]. Pour la culture de follicules préantraux, la technique la plus utilisée est aussi la culture sur membrane au sein de fines tranches d'ovaires. Elle a été pratiquée par la plupart des auteurs soit à partir d'ovaires adultes [13,55,97], soit à partir d'ovaires foétaux [53,99] et a montré des résultats positifs en terme de croissance folliculaire. Des follicules préantraux isolés ont pu être aussi cultivés soit sur membrane [1,55] soit en boîte 4 puits [98]. La formation de l'antrum est possible in vitro [1,98]. Baker en 1974 [13] a constaté que la culture de 5 jours de follicules à antrum était possible avec une bonne survie folliculaire pour certains et une

dégénérescence pour d'autres. Après formation de l'antrum, le follicule dans son ensemble n'est plus nécessaire pour assurer le développement et la maturation ovocytaire. Il a été montré que la culture de complexes cumulo-ovocytaires provenant de petits follicules à antrum pouvait amener les ovocytes à maturation. Dans l'espèce humaine, la première maturation ovocytaire in vitro a été faite par Edwards en 1965 [28]. C'est seulement en 1991 que Cha décrivit la première naissance obtenue après maturation ovocytaire in vitro d'ovocytes immatures entourés du complexe cumulo-ovocytaire provenant d'ovaires non stimulés [19]. Depuis d'autres grossesses et naissances ont été rapportées [18,56].

En conclusion, plusieurs étapes du développement folliculaire dans l'espèce humaine ont été obtenues in vitro. Ces résultats sont encore parcellaires mais encourageants. L'association des techniques permettant le développement folliculaire du stade primordial jusqu'au stade antral et celles de maturation ovocytaire in vitro à partir de complexes cumulo-ovocytaires pourrait constituer une alternative intéressante à l'autogreffe de tissu ovarien.

• La xénogreffe

➤ Revue des travaux réalisés sur la xénogreffe de tissu ovarien (Tableau 1)

Tableau 1 : Revue des plus importantes publications récentes sur la xénogreffe de tissu ovarien

| | Donneur | Receveur | Croissance folliculaire | Résultats |
|------------------------|-------------------------------|--|---|--|
| Gosden (1994) | Chat, mouton Tissu frais | Rein de souris SCID castrées | Jusqu'au stade antral précoce à 9 mois | Sécrétion estrogénique des greffons, pas d'ovulation |
| Candy (1995) | Marmouset Tissu frais | Rein de souris nues castrées (4 à 6 semaines) | Jusqu'au stade antral précoce sans stimulation | Pas de différence entre tissu frais et congelé |
| Newton (1996) | Humain Tissu frais | Rein de souris SCID castrées | Jusqu'au stade primaire à 30 jours sans stimulation | Taux de survie de 80% des primordiaux |
| Gunasena (1997) | Eléphant Tissu congelé | Bourse ovarienne de souris nues castrées | Jusqu'aux follicules antraux Sans stimulation | Survie et maturation de follicules d'éléphant dans ce modèle |
| Oktay (1998) | Humain Tissu frais | Rein de souris SCID/hpg | Follicules antraux de 5 mm à 17 semaines avec stimulation par FSH | FSH nécessaire à la croissance jusqu'aux follicules antraux |
| Oktay (2000) | Humain Tissu frais et congelé | Rein de souris SCID castrées | Mêmes taux de survie folliculaire jusqu'au stade 2 couches avec tissu frais et congelé à 22 semaines | La congélation n'altère pas les possibilités de reprise des xénogreffes de tissu ovarien humain |
| Weissman (1999) | Humain Tissu frais | Sous la peau de souris NOD-SCID mâles et femelles | Croissance folliculaire sous HCG jusqu'aux follicules antraux de 6 mm | Meilleure croissance chez les souris mâles. Pas de gain avec les agonistes du GnRH |
| Nisolle (2000) | Humain Tissu frais et congelé | Sous la peau et sous le péritoine de souris nues | Jusqu'au stade primaire à J 24 | Plus de fibrose dans les greffons congelés. Population folliculaire idem si congelé, mais meilleure survie en intra péritonéal |
| Gook (2001) | Humain Tissu frais et congelé | Sous la capsule rénale de souris SCID, castrées, > 20 semaines | 1 seul petit follicule antral avant 20 semaines. Nombreux follicules antraux après 20 semaines (maxi = 5 mm) | Pas de différence tissu frais et congelé. Follicules antraux en l'absence de stimulation |

L'utilisation d'animaux présentant un déficit immunitaire partiel (*nude*) ou complet (*SCID*) a permis de réaliser des xénogreffes qui, en l'absence d'un tel déficit, seraient immédiatement rejetées.

En 1994, Gosden et al. ont été les premiers à avoir proposé la xénogreffe comme procédé de maturation folliculaire [44]. Ces auteurs ont greffé des fragments de cortex ovarien frais de chatte et de brebis sous la capsule rénale de souris *SCID*. Les greffons furent prélevés à 9 mois, les auteurs notent une atrésie post-greffe des follicules en croissance et ils pensent que les follicules développés à long terme proviennent des follicules primordiaux qui ont survécu à la greffe. Les follicules les plus gros observés dans les greffons atteignent 3 mm et le stade antral précoce. Aucune ovulation n'est notée dans les greffons à 9 mois.

Candy et al. ont démontré la validité de ce modèle en greffant du tissu ovarien de singe marmouset dans le rein de souris *nudes* [16]. Les souris *nudes* receveuses furent castrées. Des greffons de tissu ovarien frais ($n = 6$) et congelés ($n = 19$) furent réalisés dans un but comparatif. Les sécrétions estrogéniques des greffons furent appréciées par la recherche de cellules superficielles aux frottis vaginaux. 14 greffons sur 19 furent retrouvés au moment des autopsies avec le tissu congelé et 6 sur 6 avec le tissu frais. Les prélèvements des greffons s'échelonnèrent entre 7 et 60 jours. L'apparition moyenne de l'imprégnation estrogénique se fit au bout de 20 jours avec le tissu frais et 16 avec le tissu congelé (sans différence significative). Davantage

de follicules furent retrouvés dans les greffons frais, mais sans différence significative avec le tissu congelé. Davantage de follicules avaient un aspect normal avec le tissu frais mais également sans différence significative. La croissance folliculaire fut identique dans les deux groupes jusqu'au stade antral précoce en l'absence de toute stimulation extrinsèque. L'observation précoce de follicules antraux au sein des greffons à 7 jours fait conclure par les auteurs que ces derniers ont survécu à la congélation. Cette donnée mériterait une confirmation car elle va à l'encontre de nombreux travaux. Il est possible que ces follicules d'aspect histologique normal ne soient en fait pas fonctionnels et ne puissent se développer davantage car à J60, les greffons ne comprenaient plus que des follicules primaires et primordiaux. Les faibles différences entre les populations folliculaires des greffons congelés et frais ne sont également peut être pas significatives à cause du faible nombre de greffons (manque de puissance de l'étude). Quoiqu'il en soit ce travail semble démontrer que la perte en follicules au sein des greffons est probablement plus liée au processus de la greffe elle-même qu'à celui de la congélation/décongélation. La croissance folliculaire, en l'absence de stimulation est assez difficile à évaluer dans ce travail, les auteurs l'estiment jusqu'au stade des petits follicules antraux.

Newton et al. ont également utilisé ce modèle expérimental pour faire les premiers essais de congélation du tissu ovarien humain (TOH) [68]. Le but de ce travail était de comparer l'efficacité de 4 cryoprotecteurs (DMSO,

éthylène glycol, propanediol et glycérol) sur la survie après congélation/décongélation du tissu ovarien humain. Ce travail démontre que les greffons reprennent parfaitement dans les reins de souris *SCID*. Trois semaines après la greffe, beaucoup de follicules primordiaux ont été retrouvés dans les greffons, mais également des follicules primaires jusqu'à deux couches de cellules de la granulosa (2CCG), témoignant d'un début de maturation des follicules humains dans le rein de souris *SCID*. Les taux de survie des follicules primordiaux avec les 4 cryoprotecteurs furent de 74% pour le DMSO, 84% pour l'éthylène glycol, 44% pour le propanediol et 10% pour le glycérol (seul le glycérol présentait une différence significative).

Gunasena et al. en 1998 [50] ont démontré l'intérêt théorique de la xénogreffe de tissu ovarien (XTO) pour préserver certaines espèces en voie de disparition en réalisant une XTO d'éléphant à des souris *nudes*. Les greffons ont survécu et une maturation folliculaire jusqu'au stade antral précoce fut observée en dehors de toute stimulation hormonale.

Oktay et al. en 1998 [76] ont également travaillé sur la xénogreffe de tissu ovarien humain sous la capsule rénale de souris *SCID hypogonadiques* (hpg). Les auteurs ont comparé un groupe de souris stimulées par FSH à partir de 11 semaines à un groupe stimulé par placebo. A 11 semaines, les greffons contenaient tous des follicules jusqu'au stade 2CCG. A 17 semaines, dans le groupe placebo la croissance des follicules restait bloquée au stade deux couches tandis que dans le groupe stimulé on retrouvait toutes les

populations folliculaires jusqu'à des follicules antraux de 5 mm de diamètre. Les auteurs concluent de ce travail que la croissance jusqu'au stade 2 couches est indépendante de la stimulation, par contre la croissance ultérieure nécessite de la FSH.

En 2000, Oktay et al. [75] faisaient un nouveau travail dans lequel ils comparaient les xénogreffes de tissu ovarien humain frais et congelé/décongelé sans stimulation autre que la FSH endogène des souris receveuses. A 22 semaines, ils constataient que les follicules ne dépassaient pas le stade 2CCG avec un pourcentage supérieur de follicules en croissance dans le groupe congélation. Les conclusions de ce travail furent que la congélation n'altérait pas les possibilités de reprise des greffons ovariens humains et que la FSH endogène des souris *SCID* castrées était insuffisante pour stimuler la croissance des follicules humains au delà du stade 2CCG.

En 1999, Weissman et al. [95] ont réalisé des xénogreffes de TOH sous la peau de souris *NOD-SCID*, présentant en plus de la mutation *SCID* un déficit en cellules NK, en macrophages et en activité du complément. Les greffes furent réalisées sur des souris mâles et des souris femelles, non castrées, soumises ou non à un traitement par agoniste du GnRH. 74% seulement des greffons contenaient des follicules à 2 semaines. La stimulation par gonadotrophine a abouti à une stimulation de la croissance folliculaire dans 51% de ces greffons jusqu'au stade antral (6 mm). L'utilisation des agonistes

n'a rien apporté à ces résultats, par contre la maturation folliculaire fut meilleure chez les souris mâles.

En 2000, Nisolle et coll. [70] ont réalisé des xénogreffes de TOH sous la peau et sur le péritoine de souris *nudes*. Ils comparèrent des greffes de tissu frais et congelé, s'intéressant à la survie folliculaire, à l'intensité de la fibrose et à l'angiogénèse. Les densités folliculaires dans les greffons ne furent pas influencées par la congélation, mais la densité fut un peu supérieure dans les greffons péritonéaux. Les greffons congelés présentèrent cependant plus de zones de fibrose, l'angiogénèse fut intense dans tous les types de greffe.

En 2001, Gook et al. [38] réalisèrent des xénogreffes du tissu humain frais et congelé sous la capsule rénale de souris *SCID*. Les taux de survie des greffons furent très bons dans les deux groupes, un follicule antral fut observé avant 20 semaines en dehors de toute stimulation. Après 20 semaines, de nombreux follicules antraux jusqu'à 5 mm furent observés dans les greffons. L'adjonction de FSH permit d'observer davantage de follicule antraux, mais certains greffons non stimulés contenaient des follicules antraux, prouvant que la FSH endogène des souris castrées avait suffi pour obtenir de rares maturations.

➤ **Synthèse de ces différents travaux**

A la vue de ces différentes publications concernant la XTO, quelques conclusions peuvent être tirées.

Plusieurs animaux immunodéficients sont utilisables pour recevoir des xénogreffes. Les souris *SCID* qui comportent à la fois un déficit en lymphocytes T et B semblent mieux adaptées à la xénogreffe surtout si elle doit être à long terme. Les souris *nudes* ont cependant donné de bons résultats également, même si théoriquement, elles devraient moins bien tolérer la xénogreffe. Les souris *nudes* offrent par ailleurs l'avantage de nécessiter des conditions d'élevage beaucoup plus simples que les souris *SCID*. L'utilisation de souris *NOD-SCID* proposée par Weissman [95] offre la perspective théorique d'un rejet de xénogreffe encore plus faible et donc probablement de meilleures garanties de survie à long terme des xénogreffes. La question de savoir s'il est nécessaire de castrer les souris receveuses se pose également ; plusieurs auteurs notent de meilleurs résultats après castration [51,68]. Weissman ne note pas de gain à utiliser les agonistes du GnRH chez la souris non castrée, par contre la greffe chez la souris mâle semble mieux reprendre [95]. Enfin signalons que le modèle utilisé par Oktay de souris à la fois *SCID* et *hypogonadiques* a également donné de bons résultats [76]. Des travaux sont encore nécessaires pour déterminer quel est le meilleur receveur pour les xénogreffes de tissus humains.

Les différents travaux réalisés retrouvent tous une survie folliculaire importante qui semble être la meilleure dans les greffes réalisées sous la capsule rénale. Ce dernier site semble meilleur que la greffe sur le péritoine qui est, elle-même, meilleure que la greffe dans l'espace sous-cutané. La

comparaison entre les greffons de tissu congelé et de tissu frais montre peu de différence en terme de survie folliculaire ce qui laisse penser que la déperdition en follicule est plus le résultat de la greffe elle-même que de la cryopréservation.

La maturation folliculaire est bloquée pour la plupart des auteurs au stade 2CCG en l'absence de stimulation. Il semble cependant exister des différences dans certaines espèces puisque Candy [16] sur le singe marmouset et Gunasena [50] sur l'éléphant obtiennent des follicules antraux en l'absence de toute stimulation. En ce qui concerne le tissu humain, l'adjonction de FSH ou d'HCG améliore la maturation jusqu'au stade antral, en effet en l'absence de stimulation certains auteurs n'obtiennent pas de follicules antraux [76] ou très peu [38].

Cependant aucun auteur n'est arrivé à des follicules plus gros que 5 à 7 mm. Nous ne possédons pas de données sur les possibilités de maturation finale des follicules au sein des xénogreffes et donc sur la qualité des ovocytes ainsi produits. Ce point reste la question essentielle à éclaircir en matière de XTO. De plus, aucun animal n'ayant encore été produit par XTO, la compétence des ovocytes ainsi maturés à être fécondée reste inconnue. Enfin la normalité du produit de la fécondation doit également être prouvée, c'est dire que de nombreux travaux sont encore nécessaires.

➤ **Aspects éthiques de la xénogreffe**

S'il est possible un jour d'obtenir des grossesses grâce à la XTO, il s'agira là d'un modèle expérimental tout à fait passionnant, qui justifie que l'on s'y intéresse. Une autre indication très intéressante pourrait être celle proposée par Gunasena [50] pour préserver les espèces en danger, sous réserve que les animaux produits soient normaux. Le troisième intérêt de la XTO serait la possibilité d'application en clinique humaine, mais cela pose un problème éthique majeur. Faire maturer un gamète humain dans un animal doit en effet être envisagé avec circonspection. Il est primordial de répondre à certaines questions :

- **quels sont les risques de transmission d'agent infectieux ?** ce vaste domaine ne peut pas trouver de réponse simple aujourd'hui car nous nous apercevons chaque jour que certains agents infectieux nous sont encore partiellement voire totalement inconnus.

- **existe-t-il des risques d'altération du patrimoine génétique ?** la réponse paraît clairement négative en xénogreffe d'organe ou de tissu banal ; cependant les gamètes ne constituent pas un tissu banal. Il faudrait de très nombreuses preuves indiscutables de production d'animaux normaux par XTO avant de pouvoir envisager de faire naître de la sorte un être humain, et même avec ces preuves en main, le pas restera certainement très difficile à franchir.

Un début de réflexion sur les problèmes éthiques semble s'amorcer [5,86] mais nous sommes encore bien loin d'appréhender tous les problèmes que risque de poser la mise au point de la XTO.

- ***L'allogreffe du tissu ovarien***

Cette éventualité consisterait à greffer à une patiente le tissu ovarien d'une autre. Ce procédé pourrait être par exemple un traitement de la ménopause précoce, ou une alternative à la fertilité propre des patientes soumises à un traitement anticancéreux. Le gros problème est que le rejet d'allogreffe n'épargne en rien l'ovaire, comme l'a démontré au début du siècle Marshall [62]. Il serait donc nécessaire d'instaurer un traitement immunosuppresseur chez la receveuse pour espérer un succès comme l'a obtenu Cornier chez la lapine avec de la *Ciclosporine* [20]. La lourdeur des traitements immunosuppresseurs actuels fait qu'ils ne sont concevables que pour éviter un rejet d'organe vital, tel que le rein, le cœur, le foie ou le poumon. Tout ceci paraît lourd pour préserver la fertilité, fonction qui bien qu'importante n'est pas vitale.

Tableau 2 : Différents procédés envisageables de maturation folliculaire après décongélation.

| | Principe | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|--|
| Autogreffe orthotopique | Réimplantation du tissu ovarien dans sa situation princeps | Possibilité de restauration d'une fertilité naturelle sans recours à des méthodes d'AMP | La fossette ovarienne constitue un site peu favorable à la reprise des greffons |
| Autogreffe hétérotopique | Réimplantation du tissu ovarien dans un autre site que sa situation originelle | Possibilité de choisir un site richement vascularisé favorisant la reprise des greffons | Obligation de recourir à des méthodes d'AMP pour obtenir des grossesses |
| Allogreffe | Réimplantation du tissu ovarien d'une patiente à une autre patiente receveuse | Aucun | Nécessité de traitements immuno-suppresseurs |
| Xénogreffe | Réimplantation du tissu ovarien humain dans d'autres espèces animales présentant un déficit immunitaire | Possibilité de choisir un site de réimplantation idéal autorisant une reprise optimale des greffons | Problèmes éthiques soulevés par les transplantations entre espèces humaine et animales |
| Maturation folliculaire in vitro | Culture de follicules primordiaux in vitro jusqu'à obtention d'ovocytes matures fécondables | Confort pour la patiente Absence de risque de réintroduction de maladie ovarienne résiduelle | Technique pas encore opérationnelle dans l'espèce humaine |

2

LES INDICATIONS

DE LA CRYOPRESERVATION

DU TISSU OVARIEN

La CPTO n'a pas encore fait ses preuves en terme de grossesse dans l'espèce humaine, il peut donc paraître prématuré d'envisager des indications à une technique non encore validée. Cependant, de nombreuses équipes à travers le monde ont commencé à prélever du tissu ovarien en situation clinique, faisant le pari qu'au moment de réutiliser le tissu de leur patiente, ils en sauront davantage sur la manière optimale d'utiliser ce tissu. La première tentative d'autogreffe de tissu ovarien a été récemment rapportée [73].

La CPTO offre de nombreuses possibilités théoriques dont certaines sont déjà à l'ordre du jour, tandis que d'autres ne sont envisageables qu'à moyen et à long terme. Poser l'indication d'une CPTO est donc une question d'actualité, lourde de conséquences, qui mérite d'ores et déjà une réflexion approfondie, pluridisciplinaire [10].

Rappels physiologiques

• *Multiplication des ovogonies*

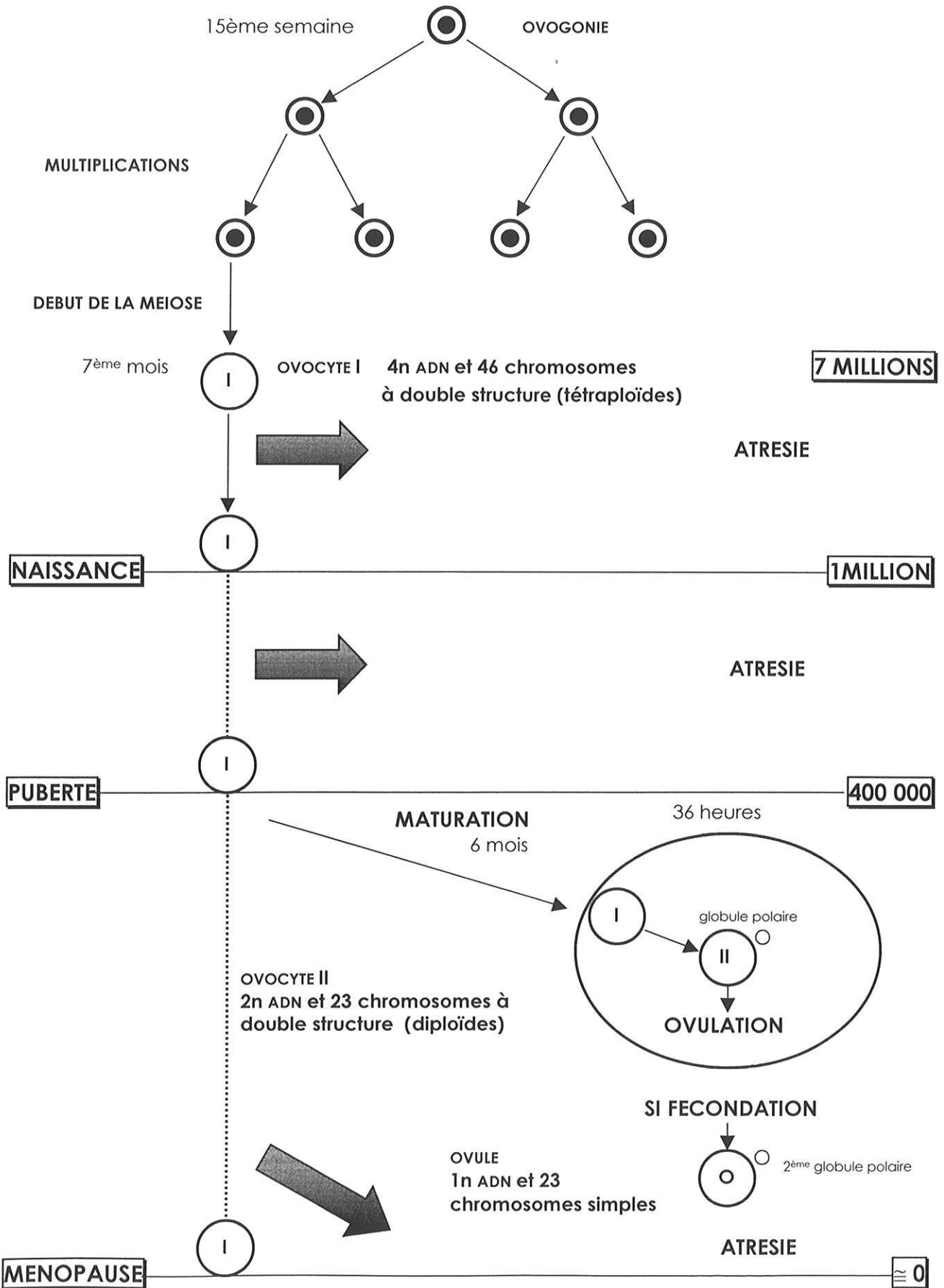
Les mitoses sont nombreuses au cours du deuxième mois de la vie intra utérine et se raréfient ensuite. On estime le nombre d'ovogonies présentes à la fin du deuxième mois de développement embryonnaire à environ 600 000 et au cinquième mois à environ 6 à 7 millions. Les estimations du nombre d'ovocytes de premier ordre (**ovocytes I**) présents à la naissance varient entre 0,7 et 1 million [33,34] (figure 4).

Cette diminution du stock dès la vie intra-utérine provient de différents facteurs conjugués [14] :

- les ovogonies non incluses dans les follicules primordiaux dégénèrent ;
- l'atrésie des follicules débute dès le cinquième mois ;
- des ovogonies quittent l'ovaire en étant expulsées à travers l'épithélium superficiel et se nécrosent à la surface de l'ovaire et dans la cavité coelomique. Ce phénomène est observé dès la 24^{ème} semaine et se poursuit jusqu'au terme.

FIGURE 4 : Ovogenèse humaine

VIE INTRA-UTERINE



- **Initiation méiotique**

Lorsque les ovogonies débutent leur méiose, elles prennent le nom d'**ovocyte**; les processus contrôlant l'arrêt des mitoses et l'entrée en méiose ne sont pas parfaitement connus.

Ainsi, les ovaires acquièrent avant la naissance un stock définitif, non renouvelable, de plusieurs millions d'ovocytes qui ont effectué la duplication de l'ADN et les *crossing-over*, puis se sont bloqués en fin de prophase de la première division méiotique. Ces ovocytes sont entourés d'une couche de cellules folliculaires pour former des **follicules primordiaux**, quiescents, qui constituent la réserve ovarienne.

- **Atrésie**

Comme nous l'avons déjà vu, le stock folliculaire commence à se réduire immédiatement dès la vie intra-utérine. L'atrésie des follicules ovariens [41] est la résultante d'une **atrésie tonique** et d'une **atrésie cyclique** liées au cycle menstruel.

L'atrésie tonique affecte surtout les follicules de la réserve. Très forte pendant la vie embryonnaire, elle diminue jusqu'à environ 35 ans et constitue la principale cause de l'épuisement de la réserve.

En revanche, à la puberté, avec le démarrage de l'activité cyclique de l'axe hypothalamo-hypophysaire, la croissance folliculaire peut se poursuivre jusqu'à l'ovulation, mais la grande majorité des follicules qui entrent en croissance s'atrophie avant l'ovulation (moins de 1/500 sera ovulé) [48]. Cette atrophie des follicules « sélectionnables » (cohorte d'où sera issu le follicule ovulatoire) est cyclique et inversement corrélée aux taux de FSH circulants ; les taux d'atrophie les plus élevés étant observés en milieu de phase lutéale.

Avec le vieillissement, la réserve s'épuise pour atteindre à la **ménopause** un effectif inférieur à 100 follicules. Cet épuisement s'accélère notablement à partir de l'âge de 38 ans en raison, soit d'une accélération de l'entrée des follicules en phase de croissance, soit d'une accélération de leur entrée en atrophie.

Ainsi, le destin « normal » de la plupart des follicules est de disparaître. Ce processus peut être considéré comme le moyen permettant à l'ovaire d'éliminer les follicules en surnombre et de produire de façon cyclique le quota ovulatoire caractéristique de l'espèce.

• **Folliculogénèse**

Le processus qui conduira un follicule donné du stade primordial au stade pré-ovulatoire ou à l'involution, s'appelle la **folliculogénèse**. Ce mot décrit « l'histoire » du follicule, l'histoire de sa croissance.

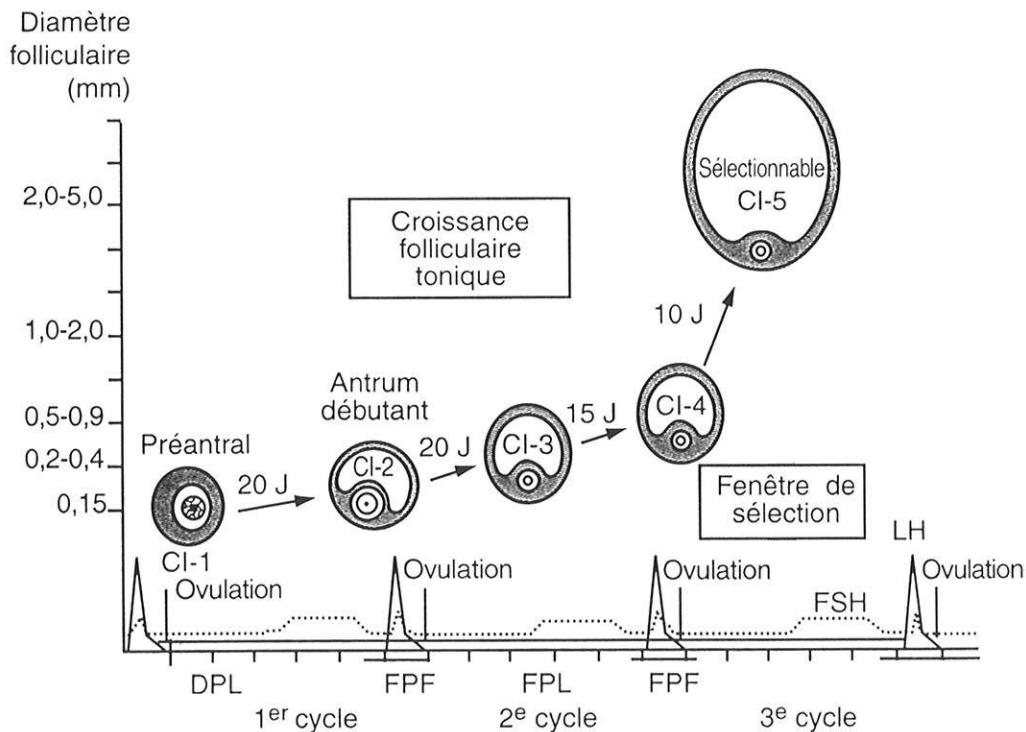
Comme nous l'avons vu précédemment, la folliculogénèse débute dès la vie fœtale et s'achève à la ménopause.

L'intervalle de temps nécessaire à un follicule primordial en début de croissance pour atteindre le stade pré-antral n'est pas connu avec certitude. Les données expérimentales réalisées chez le primate, où la croissance des petits follicules est extrêmement lente, conduisent à considérer que ce processus demande probablement plusieurs mois chez la femme. Le follicule pré-antral constitue la classe I d'une classification en 8 classes basée sur l'aspect morphologique et le nombre total de cellules de la granulosa dans chaque follicule [41]. Ces différentes classes représentent les stades successifs de développement que seul le follicule ovulatoire franchira et au cours desquels les cellules somatiques (granulosa puis thèques) présenteront d'importantes transformations morphologiques et métaboliques.

A chaque moment du cycle, des follicules deviennent pré-antraux. Bien que l'on ignore si ce processus est continu ou pulsatile, il donne naissance à des cohortes de follicules qui se développent en relative synchronie et qui sont appelées **vagues de croissance folliculaire**. Chez la femme, une seule vague par cycle donne naissance à un follicule de taille ovulatoire, les autres vagues disparaissent par élimination progressive des follicules qui les composent. La vague d'où sera issu le follicule ovulatoire prend naissance après l'ovulation. Les follicules pré-antraux (classe 1) alors présents, sont plus nombreux qu'à tout autre moment du cycle. Les modifications

endocriniennes liées à l'ovulation sont sans doute à l'origine de cette vague. A partir du stade pré-antral, 70 jours sont nécessaires au follicule pour qu'il traverse les classes 2 (antrum débutant), 3, 4 et atteigne la taille de 2 mm. Cette partie de la folliculogénèse est appelée croissance folliculaire basale ou tonique (figure 5).

Figure 5 : Folliculogénèse [41]



Chronologie du développement des follicules appartenant à la cohorte d'où sera issu le follicule ovulatoire. La croissance de cette cohorte débute avec l'entrée des follicules en classe 1 se produisant en début de phase lutéale (DLP) ; 25 jours plus tard, en fin de phase folliculaire (FPF) du cycle suivant, ces follicules différencient leur antrum et entrent en classe 2. C'est 20 jours plus tard, entre la fin de la phase lutéale (FPL) et le début de la phase folliculaire du cycle suivant qu'ils entrent en classe 3 ; 15 jours sont encore nécessaires pour que ces follicules entrent en classe 4 pendant la fin de la phase folliculaire du cycle suivant. Les follicules entrent en classe 5, 10 jours plus tard en fin de phase lutéale. Ces follicules constituent la population de follicules sélectionnables au sein de laquelle le follicule qui ovulera 15 jours plus tard sera sélectionné.

C'est en fin de phase lutéale lorsque les follicules atteignent une taille comprise entre 2 et 5 mm qu'ils deviennent sélectionnables (classe 5). Ceux-ci sont alors constitués d'un ovocyte et de cellules granuleuses ayant acquis le maximum de récepteurs à FSH afin d'avoir une activité mitotique en forte augmentation. Ces follicules ont le privilège d'être recrutés pour former une « cohorte » de 5 à 20 qui va entrer en croissance le cycle suivant [15,39,42] (figures 6 et 7). Puis parmi cette population de follicules sélectionnables, celui dont les cellules granuleuses présentent la plus grande affinité à la FSH et la plus grande activité aromatasase, donc une vitesse de croissance plus grande, sera sélectionné pour devenir le **follicule dominant** ou **futur follicule ovulatoire** (figure 8). Les cellules granuleuses ou cellules de la granulosa jouent un rôle d'encadrement de l'ovocyte, FSH dépendant ; elles assument la biotransformation des androgènes en estrogènes nécessaire à la préparation de l'organisme de la femme en général et en particulier à la préparation de l'endomètre en vue de la nidation de l'œuf.

Figure 6 : Cohorte de follicules primordiaux

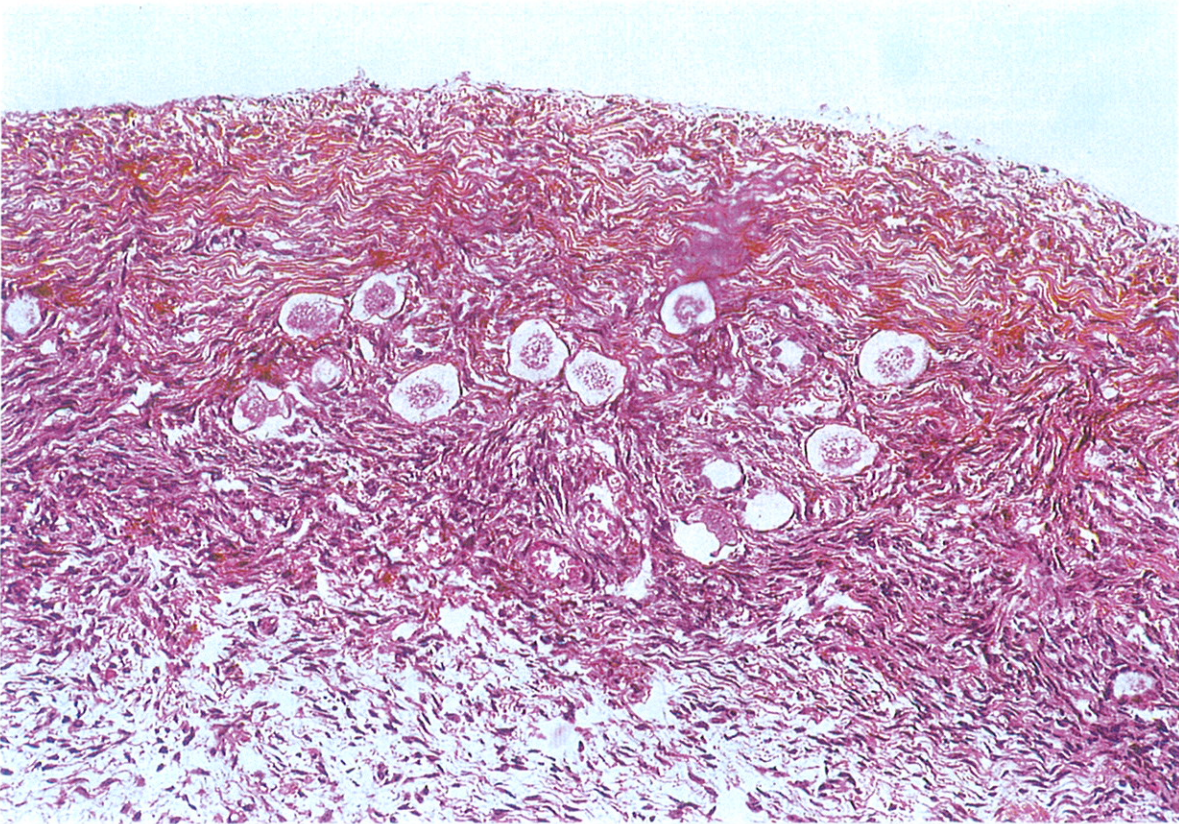


Figure 7 : Le follicule dominant parmi la cohorte de follicules en croissance

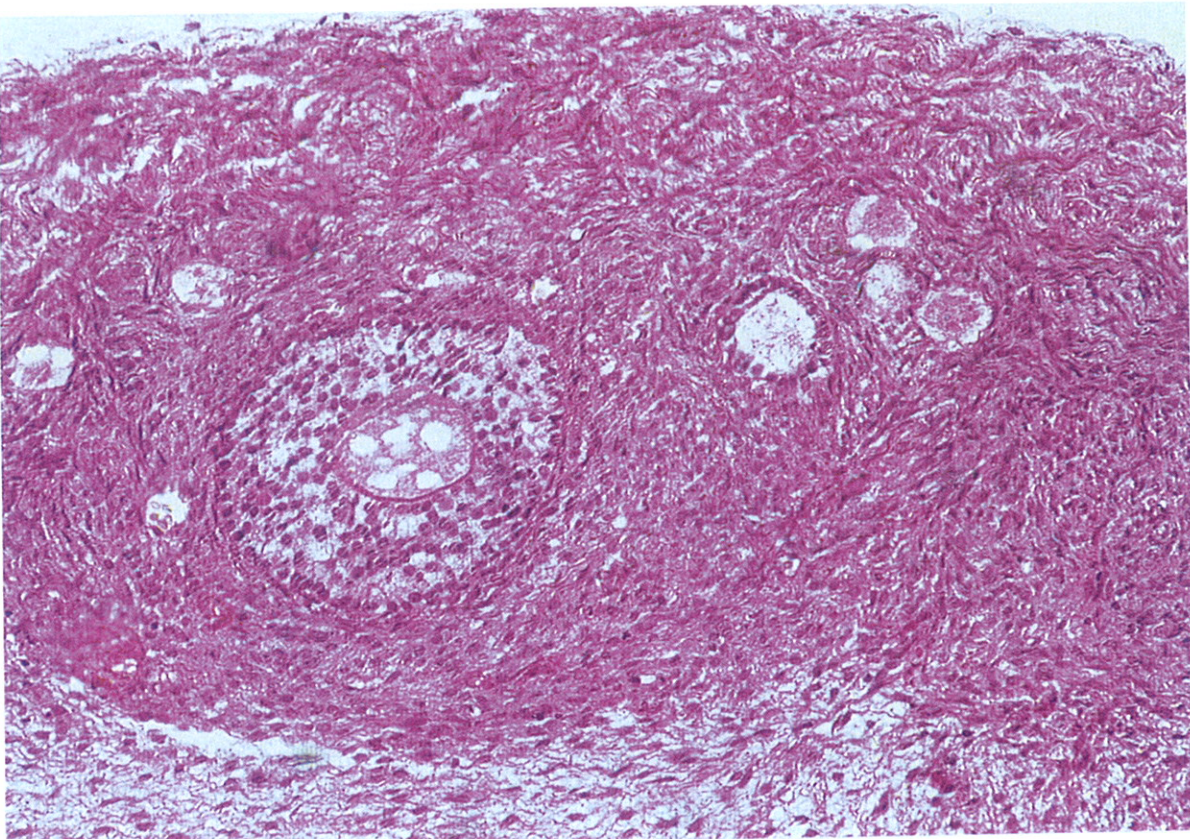
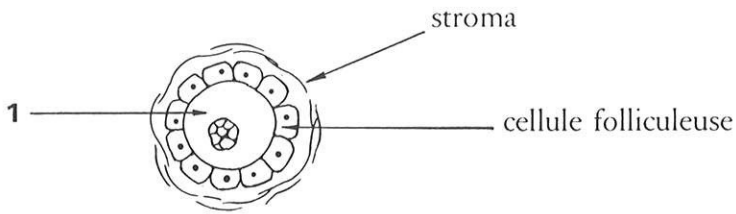
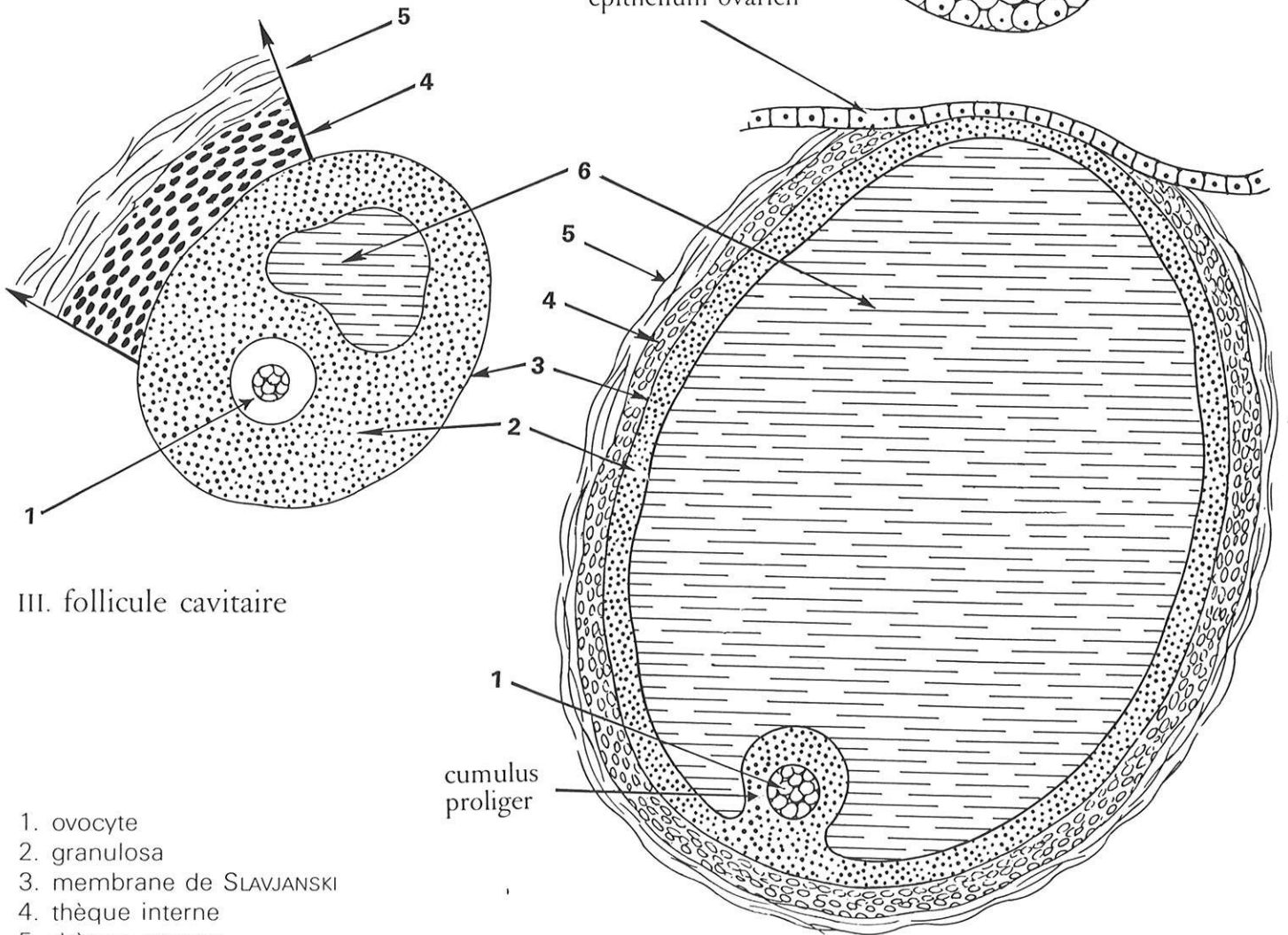
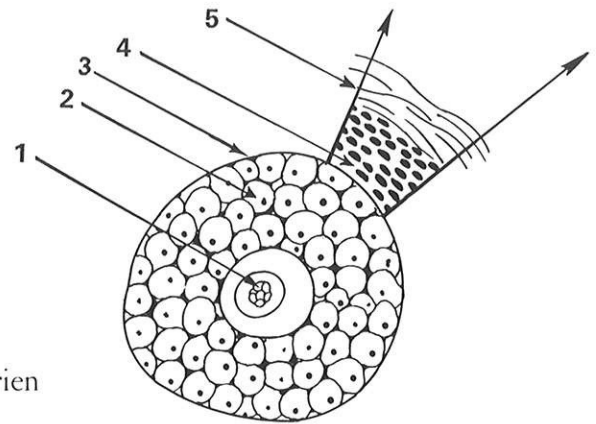


Figure 8 : La maturation folliculaire

I. follicule primordial



II. follicule primaire



III. follicule cavitaire

cumulus proliger

- 1. ovocyte
- 2. granulosa
- 3. membrane de SLAVJANSKI
- 4. thèque interne
- 5. thèque externe
- 6. antrum (liquide folliculaire)

IV. follicule mûr (dit de DE GRAAF)

- **Ovulation**

Lorsque la décharge ovulante se produit, elle déclenche une cascade d'évènements conduisant à un remaniement de la structure du follicule pré-ovulatoire, à sa rupture, puis à la libération de l'ovocyte. Chez la femme, l'intervalle de temps séparant le pic de LH de l'ovulation est d'environ 40 heures. La décharge ovulante induit la reprise de la méiose et sa poursuite jusqu'au stade de métaphase de la deuxième division avec expulsion du premier globule polaire. L'ovocyte est alors appelé **ovocyte II** et la méiose est de nouveau bloquée jusqu'à la fécondation.

- **Phase lutéale**

Après la rupture folliculaire et la « ponte » de l'ovocyte, ce qui reste du follicule mature se transforme en **corps jaune** qui sécrète de l'oestradiol et de la progestérone.

Ainsi sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, l'ovaire est stimulé par la FSH et la LH mais les fonctions exocrines et endocrines sont étroitement liées puisque les hormones stéroïdiennes sont sécrétées par les cellules somatiques des follicules en cours de maturation.

A quoi pourrait servir

la cryopréservation du tissu ovarien ?

La fonction ovarienne est double, **endocrine** avec la sécrétion des hormones folliculaires et **exocrine** avec la production mensuelle du gamète femelle, l'ovocyte. Ces deux fonctions sont assurées par les follicules qui contiennent à la fois les gamètes et les cellules somatiques capables de sécréter les hormones stéroïdiennes et peptidiques. La fonction endocrine peut cependant être suppléée par une hormonothérapie substitutive. Par contre la fonction exocrine est irremplaçable et le don d'ovocyte est un substitut ne permettant pas à la patiente de transmettre son génome à sa descendance.

La population en cellules germinales d'une femme atteint son maximum vers 6 mois de vie intra-utérine ; à la naissance, il n'existe déjà plus qu'un million de cellules germinales au sein des follicules primordiaux [33,34]. Cette réserve folliculaire est un capital précieux qui va s'amenuiser tout au long de la vie et qui, une fois perdue, ne peut être reconstituée. Le but essentiel de la

CPTO est de préserver la fertilité de la patiente en protégeant son tissu ovarien des menaces qui pèsent sur la réserve folliculaire.

Trois types de menace pèsent sur l'ovaire. La première est la plus inéluctable, c'est celle du temps. A partir de la naissance (et même avant comme nous l'avons vu) la population folliculaire subit une décroissance exponentielle qui s'accélère vers 38 ans, la réserve est pratiquement épuisée à la ménopause [34]. Pendant toute la vie reproductive d'une patiente, environ 500 follicules seulement atteindront une maturation complète avec émission d'un ovocyte mature, le reste des follicules sera détruit par apoptose et atrophie folliculaire [48]. La CPTO ne pourrait-elle pas constituer une alternative à cet énorme gaspillage ?

La seconde menace qui pèse sur le tissu ovarien est la destruction anormalement rapide du stock folliculaire que l'on rencontre dans certaines situations pathologiques responsables de ménopauses précoces. D'autre part, il est parfois nécessaire quand l'ovaire est lui-même atteint ou susceptible de l'être par un processus tumoral, d'enlever chirurgicalement une partie plus ou moins grande du tissu ovarien. Toute ablation du tissu ovarien aboutit à une diminution du stock folliculaire.

Enfin, la troisième menace pour le tissu ovarien est iatrogène, plus particulièrement chez les patientes qui doivent subir un traitement anticancéreux. Deux des principales armes contre le cancer sont la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces deux types de thérapeutiques sont

très délétères pour les cellules germinales [61] et doivent être parfois largement utilisées chez des jeunes femmes voire des enfants. La CPTO pourrait alors nous permettre de protéger efficacement la réserve folliculaire.

En reprenant chacune des trois menaces pour les follicules nous allons voir qu'elles sont les possibilités actuelles que nous offre la CPTO.

- ***La destruction du stock folliculaire liée au temps***

Si on réalise une ovariectomie unilatérale à une jeune fille de 20 ans et que l'on congèle son cortex ovarien, il a été estimé que l'âge de sa ménopause ne sera alors avancé que de quelques années [34]. Si le tissu ovarien prélevé à 20 ans était greffé à la patiente au moment de cette ménopause vers 45 ans, la durée des cycles ovariens pourrait alors être prolongée au delà de l'âge habituel de la ménopause et le besoin d'une hormonothérapie substitutive serait d'autant repoussé. Ceci a clairement été démontré chez la souris [35]. Le problème crucial est de savoir combien de temps le cortex ovarien ainsi cryopréservé puis autogreffé serait fonctionnel. De combien d'années pourrait-on ainsi repousser l'âge de la ménopause ? Dans l'état actuel des choses, il n'est pas possible de répondre à cette question. Chez l'animal, il est clair que le processus de la CPTO et de l'autogreffe fait perdre des follicules [12]. Les premiers résultats humains rapportés par Oktay semblent montrer un épuisement très rapide des

greffons, cependant la technique de greffe n'a peut-être pas été optimale [73,74]. L'intensité de la perte folliculaire après cryopréservation et greffe dans l'espèce humaine n'est pas connue avec suffisamment de précision et les premiers résultats doivent inciter à la prudence. Les notions de croissance folliculaire au sein des greffons sont encore vagues [9] ainsi que la durée de vie de ces greffons [12]. De nombreux travaux sont donc encore nécessaires avant d'envisager cette indication futuriste à la CPTO.

- ***Les situations pathologiques qui menacent le stock folliculaire***

Certaines anomalies chromosomiques notamment au niveau du chromosome X, comme le syndrome de Turner complet et en mosaïque ou des délétions, des inversions ... exposent à une ménopause précoce. On observe également un épuisement anormalement précoce des follicules dans les galactosémies congénitales, certaines maladies auto-immunes et certaines maladies infectieuses [2].

Dans certaines de ces situations, il est parfois possible de prédire une ménopause prématurée et il est donc théoriquement possible de prélever du tissu ovarien chez ces patientes pour pouvoir l'utiliser au cas où elles souhaiteraient des maternités tardives. Il serait nécessaire de réaliser ce prélèvement le plus tôt possible car le stock folliculaire décroît très vite dans

ces situations. La difficulté majeure serait d'estimer précisément le risque de ménopause précoce et à quel âge elle surviendrait. En pratique il est très difficile d'estimer ce risque et dans l'état actuel des choses il semble encore prématuré de proposer cette indication pour la CPTO car cela pourrait faire perdre à ces patientes les faibles chances de maternité spontanée qui existent parfois chez elles.

Il y a d'autres situations où la réserve folliculaire est prématurément compromise, il s'agit des situations où il est nécessaire d'enlever chirurgicalement tout ou partie du tissu ovarien, comme par exemple dans les tumeurs ovariennes. Le cancer épithélial de l'ovaire survient rarement chez la jeune femme en âge de procréer, mais les tumeurs borderlines, les tumeurs germinales et stromales de l'ovaire sont au contraire fréquentes chez la femme jeune ou l'enfant. Dans ces pathologies ovariennes il est souvent nécessaire de recourir à une ovariectomie parfois bilatérale, dès lors, deux cas de figure sont possibles :

→ *s'il s'agit d'une ovariectomie curative*, la maladie néoplasique primitive ou métastatique a atteint l'ovaire que l'on enlève. L'analyse anatomopathologique de la tumeur est bien sûr nécessaire. Il peut cependant exister à côté de la tumeur des zones de cortex ovarien d'apparence saine macroscopiquement. Il peut être intéressant de congeler ce cortex ovarien qui de toute façon serait perdu pour la patiente. Le choix du cortex à congeler doit être fait en présence du médecin

anatomopathologiste. Toute la médullaire de l'ovaire, qui ne présente aucun intérêt pour la congélation, doit également être confiée à l'anatomopathologiste. La décision est difficile à prendre en cas de tumeur borderline de l'ovaire chez la femme jeune. Il est possible de se contenter d'une simple kystectomie, la CPTO pourrait alors permettre plus de sécurité en congelant le cortex péritumoral, mais il n'est pas sûr que cela ne fasse pas perdre définitivement les chances de fertilité de la patiente car des grossesses ont été décrites avec des fragments d'ovaires laissés en place avec ablation d'un kyste borderline [54]. C'est dire que la décision de prélever du cortex ovarien dans cette situation est difficile à prendre.

Dans ce cas de figure, le risque de réinduire le cancer par autogreffe de tissu ovarien existe (comme nous l'avons souligné plus haut) et semble important. L'autogreffe paraît donc prohibée et seules des alternatives comme la MFIV pourront être proposées à ces patientes pour utiliser leur tissu.

→ *s'il s'agit d'une ovariectomie prophylactique* : l'ovaire n'est pas atteint par le cancer, mais le risque d'une atteinte microscopique ou future fait réaliser une ovariectomie à titre prophylactique. Là encore la congélation du cortex ovarien paraît être une bonne solution car de toute façon ce cortex sera perdu pour la patiente. Le concours du médecin anatomopathologiste semble encore particulièrement appréciable. Toute zone lui paraissant suspecte doit lui être confiée ainsi que la totalité de la médullaire. Si l'analyse anatomopathologique de la médullaire et du cortex

macroscopiquement suspect est négative, l'autogreffe semble envisageable. Si les prélèvements sont positifs nous nous retrouvons dans la situation d'une ovariectomie curative et l'autogreffe est prohibée.

L'ovaire est également menacé chez les patientes porteuses de certaines mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 qui sont fortement exposées au risque de cancer de l'ovaire [36,60]. Le risque est suffisamment important chez ces patientes pour qu'une ovariectomie prophylactique soit recommandée vers 35 ans [23,69]. On pourrait bien sûr concevoir de congeler ce cortex extrait de manière prophylactique. Mais vers 35 ans, la réserve folliculaire est déjà fortement diminuée par le temps et la cryopréservation est probablement peu ou pas efficace à cet âge. Il serait beaucoup plus intéressant de prélever le tissu de ces patientes beaucoup plus tôt. Vers l'âge de 20 ans par exemple, si aucun projet de grossesse n'est réalisable à court ou moyen terme, il serait possible de réaliser une ovariectomie unilatérale avec CPTO, ce qui permettrait à ces jeunes femmes, si elles désirent une grossesse au delà de 35 ans d'avoir du tissu ovarien stocké, disponible.

- **Les menaces iatrogènes pour la réserve folliculaire**

On sait que les rayons X détruisent les follicules primordiaux de manière dose dépendante, il en est de même pour les agents alkylants utilisés en chimiothérapie [61,93] (tableau 3). La plupart des autres drogues de chimiothérapie détruisent les follicules en croissance, mais n'entament pas la réserve des follicules primordiaux [58]. La CPTO avant ce type de traitement protégerait le stock folliculaire des patientes et éviterait également leur effet mutagène sur les cellules germinales [27,66,96] (figure 9). Les procédés utilisés habituellement dans ces situations sont la transposition ovarienne ou la congélation d'embryon ou d'ovocyte et sont souvent insuffisants ou inadaptés. Par ailleurs, ces autres possibilités n'excluent en rien la CPTO : on peut imaginer dans certaines situations associer la transposition d'un ovaire et la CPTO de l'autre ou réaliser une CPTO après une induction d'ovulation pour cryopréserver des embryons ou des ovocytes matures.

Le problème est qu'il est difficile d'évaluer l'intensité de la destruction folliculaire pour une patiente donnée, tant les variations individuelles de susceptibilité à la radiothérapie et à la chimiothérapie sont imprévisibles. Schématiquement, on estime qu'une irradiation ovarienne de 9 Grays est castratrice dans l'espèce humaine, mais il a été rapporté des grossesses après des irradiations bien supérieures [3,78,92], voire même après trachélectomie élargie, curiethérapie et irradiation pelvienne, sans

transposition ovarienne [63] ! De même, une dose totale de 20g de cyclophosphamide est réputée castratrice, mais là aussi de nombreuses variations ont été rapportées. C'est dire que la plus grande prudence doit être de mise avant d'être affirmatif sur la fonction ovarienne des patientes après ce type de traitement.

Dans l'état actuel des connaissances, il semble prudent de réserver la CPTO aux patientes qui de toutes façons n'ont rien à perdre car les traitements qui leur seront proposés vont les ménopausier ou au moins amputer énormément leur réserve folliculaire. Il s'agit des patientes qui vont subir une irradiation corporelle totale, une chimiothérapie par agents alkylants à doses importantes ou une association radiothérapie pelvienne-chimiothérapie.

En pratique, ces situations se rencontrent dans certaines tumeurs solides de l'enfant, telles que le néphroblastome, le rhabdomyosarcome, le sarcome d'Ewing, le médulloblastome. Chez l'adulte, les tumeurs du sein ou du col utérin de la femme jeune entrent parfois dans cette catégorie. A tout âge, le traitement des hémopathies malignes peut être source de destruction du stock folliculaire. Pour ce qui est des leucémies aiguës le risque de **maladie ovarienne résiduelle** est grand et le risque de transmission de cellules malignes par autogreffe semble réel. Il serait donc plus logique de prélever le tissu ovarien en phase de rémission avant une intensification thérapeutique par exemple. Même au prix de ces précautions, l'autogreffe ne serait pas

dénuée de risque. Par contre, pour d'autres hémopathies comme la maladie de Hodgkin, le risque de maladie ovarienne résiduelle est très faible [64].

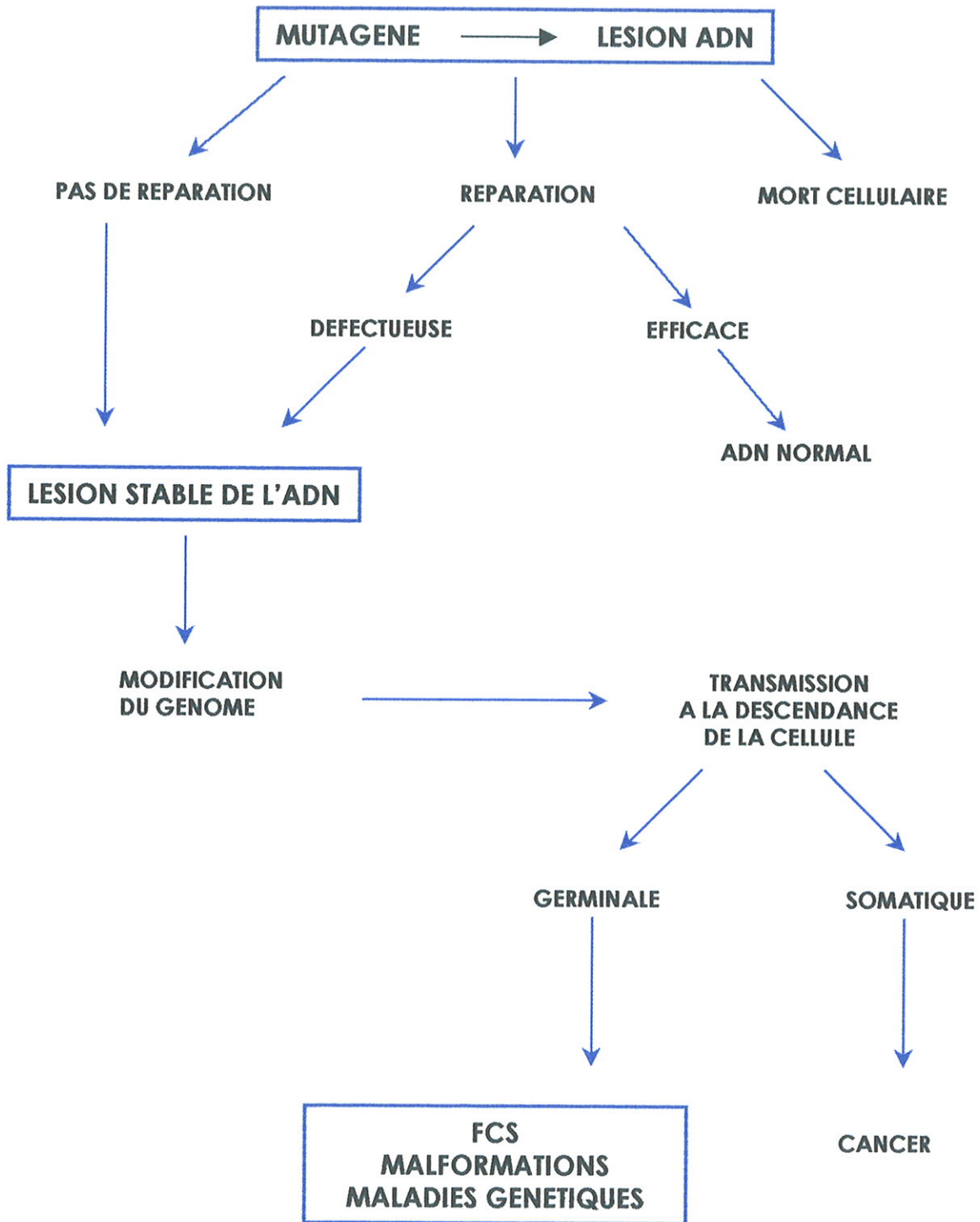
Une autre catégorie de pathologie non maligne pourrait également bénéficier de la CPTO, il s'agit de toutes les maladies dont le traitement comporte l'utilisation des agents alkylants au long cours. Il s'agit de certaines thalassémies, de lupus érythémateux, de syndromes néphrotiques, de périartérites noueuses ... Dès lors que la dose totale de cyclophosphamide dépasse 10g, il est licite de penser à la CPTO.

TABLEAU 3 : Médicaments antimétaboliques

| MÉDICAMENTS INTERAGISSANT AVEC L'ADN | | | |
|---|--------------------------------|------------------------------------|------------|
| ALKYLANTS CLASSIQUES | | | |
| - Moutardes à l'azote | | - Autres alkylants | |
| Chlorambucil | CHLORAMINOPHENE® | Cyclophosphamide | ENDOXAN® |
| Chlorméthine | CARYOLYSINE® | Ifosfamide | HOLOXAN® |
| Estramustine | ESTRACYT® | Mitomycine | AMECYTINE® |
| Melphalan | ALKERAN® | Pipobram | VERCYTE® |
| | | Thiotepa | THIOTEPA® |
| DONNEURS DE METHYL | | | |
| - Nitroso-urée | | - Autres donneurs de méthyl | |
| Carmustine | BCNU® | Altretamine | HEXASTAT® |
| Fotemustine | MUPHORAN® | Dacarbazine | DETICENE® |
| Lomustine | BELUSTINE® | Procarbazine | NATULAN® |
| Streptozocine | ZANOSAR® | | |
| ORGANOPLATINE | | | |
| Carboplatine | PARAPLATINE® | | |
| Cisplatine | CISPLATINE®, CISPLATYL® | | |
| Oxaliplatine | ELOXATINE® | | |
| AGENTS SCINDANTS | | | |
| Bléomycine | BLEOMYCINE® | | |
| ANTIMÉTABOLIQUES | | | |
| ANTIFOLIQUES | | | |
| Méthotrexate | METHOTREXATE® LEDERTREXATE® | | |
| ANTIPURIQUES | | | |
| Azathioprine | IMUREL® | | |
| Cladribine | LEUSTATINE® | | |
| Fludarabine | FLUDARA® | | |
| Mercaptopurine | PURINETHOL® | | |
| Pentostatine | NIPENT® | | |

| ANTIPYRIMIDIQUES | | | |
|---|---|--|--|
| Cytarabine Fluoro-uracile | ARACYTINE®, CYTARBEL®, FLUORO-URACILE® | | |
| INHIBITEURS DES TOPO-ISOMERASES | | | |
| INHIBITEURS DES TOPO-ISOMERASES I | | | |
| Irinotécam | CAMPTO® | | |
| INHIBITEURS DES TOPO-ISOMERASES II | | | |
| - Anthracyclines | | - Autres intercalants | |
| Daurorubicine Doxorubicine | CERUBIDINE®, ADRIBLASTINE®, DOXORUBICINE® | Amsacrine Elliptinium Mitoxantrone | AMSIDINE®, CELIPTIUM®, NOVANTRONE® |
| Epirubicine Idorubicine Pirarubicine | FARMORUBICINE®, ZAVEDOS®, THEPRUBICINE® | - Epipodophylotoxines | |
| | | Etoposide Téniposide | CEELTOP®, ETOPOSIDE®, VEPESIDE®, VEHEM® |
| AGENTS DU FUSEAU | | | |
| ALCALOÏDES (INHIBITEURS DU FUSEAU) | | | |
| Vinblastine Vincristine | VINBLASTINE®, VELBE®, ONCOVIN®, VINCRISTINE® | Vindésine Vinorelbine | ELDISINE®, NAVELBINE® |
| TAXOÏDES (STABILISANTS DU FUSEAU) | | | |
| Docetaxel Paclitaxel | TAXOTERE®, TAXOL® | | |
| AUTRES | | | |
| Asparaginase Chlorure de strontium Hydroxycarbamide | KIDROLASE®, METASTRON®, HYDREA® | Mitogazone Plicamycine | METHYL-GAG®, MITHRACINE® |

Figure 9 : Effets des agents mutagènes



Les problèmes soulevés par la cryopréservation de tissu ovarien

- ***Le problème de l'âge***

Pour la CPTO, l'âge des patientes est un facteur déterminant. Il est vraisemblable que les prélèvements de tissu ovarien au delà de 35 ans sont inutiles. En effet à cet âge, la population folliculaire est déjà largement réduite [34] et la perte additionnelle engendrée par le processus de la cryopréservation rendrait le tissu trop pauvre en follicules pour espérer obtenir des grossesses dans l'état actuel des possibilités.

Par opposition, chez l'enfant la CPTO est une technique très intéressante car l'ovaire contient alors beaucoup de follicules primordiaux et les prélèvements permettront le stockage d'un nombre important de follicules. Notons par ailleurs que chez l'enfant, la cryopréservation de l'ovocyte ou de l'embryon est impossible. Enfin rappelons que les enfants n'auront besoin de leur tissu ovarien que dans de nombreuses années voire quelques décennies, on peut espérer alors savoir utiliser le tissu prélevé au

mieux. Pour toutes ces raisons, ce sont les enfants qui pourraient bénéficier au mieux de la CPTO.

- ***Le problème de la quantité de tissu à collecter***

Quand une décision de prélèvement de tissu ovarien est prise, la première question à laquelle il faut répondre est quelle quantité de tissu faut-il prélever ? Prendre la décision de prélever le tissu ovarien d'une patiente est lourde de conséquences, surtout pour une technique qui n'a pas encore fait la preuve de son efficacité dans l'espèce humaine en terme de grossesse. Nous avons vu par ailleurs que même après des traitements réputés totalement castrateurs, certaines grossesses pouvaient survenir à cause des grandes variations de susceptibilité individuelle. Il est donc souvent difficile d'affirmer qu'une patiente sera définitivement castrée par ses traitements anticancéreux. Ces différents arguments font qu'il semble licite d'être économe sur la quantité de tissu prélevé, pour laisser d'éventuelles chances de grossesse spontanée aux patientes.

A l'opposé, il est nécessaire de disposer d'une quantité de tissu assez importante pour espérer obtenir des grossesses. Même si les données dans l'espèce humaine ne sont pas disponibles, les travaux expérimentaux chez l'animal montre que les greffons s'épuisent assez rapidement en follicules

dans certaines espèces comme le mouton [9,12]. Le prélèvement doit donc être suffisamment important pour garder un espoir raisonnable de grossesse.

En pratique l'équipe du CHRU de Limoges a pris l'habitude de prélever un ovaire chez l'adulte. Chez l'enfant, il est possible d'être encore plus économe, et le prélèvement d'un demi-ovaire procure un nombre important de follicules.

• ***Le devoir d'information des patientes***

Comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises, la CPTO n'a pas encore fait ses preuves dans l'espèce humaine, il est donc inconcevable de la considérer comme une méthode validée, utilisable en routine. Il est indispensable d'informer loyalement les patientes des limites de cette méthode et des autres procédés qui pourraient lui être proposés. La décision de réaliser une CPTO doit donc être prise conjointement par la patiente et l'équipe soignante [86]. Cette information est particulièrement difficile à fournir aux enfants qui sont, comme nous l'avons vu les principaux bénéficiaires potentiels de la CPTO. Les parents doivent bien sûr être totalement informés et impliqués dans la démarche.

Enfin rappelons que le stockage du tissu devra se faire pour des années, cela nécessite une organisation extrêmement rigoureuse, du type de celle qui est en vigueur pour la cryopréservation du sperme.

- **Les problèmes éthiques et législatifs**

La possibilité de congeler le tissu ovarien amène à poser de nombreuses questions au législateur : que faire du tissu si la patiente décède ? Jusqu'à quel âge est-il licite de prélever et de greffer le tissu ? Ces questions sont quelques-unes de celles auxquelles il paraît opportun de prévoir rapidement des réponses.

La conservation du tissu ovarien n'est pas prévue par les lois actuelles. Congelons-nous du tissu ou des gamètes ? Les lois régissant ces deux types de congélation sont très différentes, ainsi que les lieux où doivent être stockés ces tissus. A l'évidence, le tissu ovarien est très particulier puisqu'il est doté des propriétés endocriniennes d'un tissu, se rapprochant en cela des îlots de Langherans ou des glandes parathyroïdes que l'on sait également congeler. Mais le tissu ovarien contient aussi des gamètes immatures et l'arrière pensée, en le congelant, est bien de constituer une banque d'ovocytes pour la patiente. Ainsi faut-il conserver le tissu dans des banques de tissus ou dans les CECOS ?

Nous n'avons pas la prétention de répondre à toutes ces questions, mais il paraît nécessaire de les poser aux instances compétentes dès maintenant.

CONCLUSION

En conclusion, il apparaît qu'il existe déjà des circonstances où la CPTO peut être proposée aux patientes. Ces situations restent rares, chaque indication nécessitant une évaluation minutieuse de ce que peut apporter la CPTO comparativement aux autres techniques utilisables ou à l'abstention thérapeutique. Cette évaluation doit être multidisciplinaire, et la patiente parfaitement informée.

Insistons sur la nécessité de poursuivre les travaux de recherche sur les manières d'utiliser le tissu ovarien cryopréservé. Rappelons néanmoins que d'autres voies de recherche sont possibles notamment en cancérologie, laissant espérer qu'il sera peut être un jour possible de soigner le cancer sans détruire les cellules germinales ; ce jour là, la CPTO aura perdu l'une de ses principales indications.

BIBLIOGRAPHIE

[1] ABIR R, FRANKS S, MOBBERLEY M.

Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles.

Fertil Steril 1997, 68 : 682-688.

[2] ANASTI JN.

Premature ovarian failure: an update.

Fertil Steril 1998, 70 : 1-15.

[3] ATKINSON HG, APPERLEY JF, DAWSON K, GOLDMAN JM.

Successful pregnancy after allogenic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia.

Lancet 1994, 344 : 199.

[4] AUBARD Y.

Etude de l'autogreffe ovarienne après cryopréservation chez l'animal.

Mémoire de DEA de transplantation d'organes et greffes de tissus.

Faculté de médecine de Besançon et Dijon, 1993.

[5] AUBARD Y.

More to ovarian transplantation than meets the eye.

Fertil Steril 2000, 74 : 423-424.

[6] AUBARD Y, LAVIGNAC MP, GRANDJEAN MH, PIVER P, TEISSIER MP.

Autogreffes orthotopiques de fragments ovariens chez le rat avec grossesses.

Contracep Fertil Sex 1996, 24 : 852-855.

[7] AUBARD Y, NEWTON H, PIVER P, CLAVÈRE P, FERMEAU V, GOSDEN RG.

The preservation of the follicular population and fertility in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue.

10 th World Congress of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Vancouver (Canada), 24-28 May, 1997 : 99-103. Monduzzi Editore.

[8] AUBARD Y, NEWTON H, SCHEFFER G, GOSDEN R.

Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1998, 79 : 83-7.

[9] AUBARD Y, PIVER P, COGNIE Y, FERMEAUX V, POULIN N, DRIANCOURT MA.

Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep.

Hum Reprod 1999, 14 : 2149-2154.

[10] AUBARD Y, POIROT C, PIVER P, GALINAT S, TEISSIER MP.

Are there indications for ovarian tissue cryopreservation ?

Fertil Steril 2001, 76 : 414-415.

[11] AUBARD Y, TEISSIER MP, BAUDET JH.

Greffes et transplantations ovariennes chez la femme : le point.

Rev Fr Gynécol Obstét 1993, 88 : 583-590.

[12] BAIRD DT, WEBB R, CAMPBELL BK, HARKNESS LM, GOSDEN RG.

Long-term Ovarian Function in Sheep after ovariectomy and Transplantation of Autografts Stored at - 196 c.

Endocrinology 1999, 140 : 462-471.

[13] BAKER TG, NEAL P.

Organ culture of cortical fragment and Graafian follicles from human ovaries.

J Anat 1974, 2 : 361-371.

[14] BARRIERE P, MIRALLIE S, JEAN M.

Embryologie de l'appareil génital féminin.

Encycl Méd Chir (Elsevier , Paris), Gynécologie, 10-A-08, 2000, 11p.

[15] BERCOVICI JP, BOOG G.

Physiologie ovarienne et régulation neuro-endocrinienne du cycle menstruel.

Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), 30-A-10, 1986, 4p.

[16] CANDY CJ, WOOD MJ, WHITTINGHAM DG.

Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation.

Hum Reprod 1995, 10 : 2334-2338.

[17] CARROLL J, WHITTINGHAM DG, WOOD MJ, TELFERT E, GOSDEN RG.

Extra-ovarian production of mature oocytes from frozen primary follicles.

J Reprod Fertil 1990, 90 : 321-327.

[18] CHA K, HAN S, CHUNG H, CHOI D, LIM J, LEE W et al.

Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome.

Fertil Steril 2000, 73 : 978-983.

[19] CHA K, KOO J, KO J, CHOI D, HAN S, YOON T.

Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program.

Fertil Steril 1991, 55 : 109-113.

[20] CORNIER E, SIBELLA P, CHATELET F.

Etudes histologiques et devenir fonctionnel des greffes de la trompe et de l'ovaire chez la rate.

J Gynecol Obstet Biol Reprod 1985, 14 : 567-573.

[21] CORTVINDT R, SMITZ J, VAN STEIRTEGHEM A.

In vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system.

Hum Reprod 1996, 11 : 2656-2666.

[22] COX SL, SHAW J, JENKIN G.

Follicular development in transplanted fetal and neonatal mouse ovaries is influenced by gonadal status of the adult recipient.

Fertil Steril 2000, 74 : 366-371.

[23] DAUPLAT J, BREMOND A, LEFRANC JP.

L'ovariectomie prophylactique dans la prévention du risque génétique de cancer de l'ovaire.

In: INSERM, ed. Risques héréditaires de cancer du sein et de l'ovaire. Quelle prise en charge ? Paris: 1998: 383-399.

[24] DEANESLY R.

Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing.

J Endocrinol 1954, 11 : 197-200.

[25] DEANESLY R.

Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing.

Proc Roy Soc Biol 1957, 147 : 412-421.

[26] DEANESLY R, PARKES AS.

Delayed development of grafts from frozen ovarian tissue.

J Endocrinol 1957, 14 : 35.

[27] DONNEZ J, BASSIL S.

Indications for cryopreservation of ovarian tissue.

Hum Reprod Update 1998,4 : 248-259.

[28] EDWARDS RG.

Maturation in vitro of human ovarian oocytes.

Lancet 1965, 2 : 926-929.

[29] EHRSAM A, VARESE A.

Transformations physico-chimiques liées à la cryopréservation : incidence sur les systèmes biologiques.

Tech Biol 1987, 6 : 269-278.

[30] EPPIG JJ, O'BRIEU MJ.

Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles.

Biol Reprod 1996, 54 : 197-207.

[31] EPPIG JJ, SCHROEDER AC.

Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilisation in vitro.

Biol Reprod 1989, 41 : 268-276.

[32] ERICKSON GF, DANFORTH DR.

Ovarian control of follicle development.

Am J Obstet Gynecol 1995, 172 : 736-749.

[33] FADDY MJ, GOSDEN RG.

A mathematical model for follicle dynamics in human ovaries.

Hum Reprod 1995, 10 : 770-775.

[34] FADDY MJ, GOSDEN RG, GOUGEON A, RICHARDSON SJ, NELSON JF.

Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life - Implications for forecasting menopause.

Hum Reprod 1992, 7 : 1342-1346.

[35] FELICIO LS, NELSON YF, FINCH CE, GOSDEN RG.

Restoration of ovulating cycles by young ovarian grafts in aging mice: potentiation by long-term ovariectomy decrease with age.

Proc Nat Acad Sci USA 1983, 80 : 6076-6080.

[36] FORD D, EASTON DF, BISHOP T, NAROD SA, GOLDGAR DE.

Risk of cancer in brca1 mutation carriers.

Lancet 1994, 343 : 692-695.

[37] GOOK AD, EDGAR DH, STERN C.

Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol.

Hum Reprod 1999, 14 : 2061-2068.

[38] GOOK DA, MCCULLY BA, EDGAR DH, MCBAIN JC.

Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting.

Hum Reprod 2001, 16 : 417-422.

[39] GOUGEON A.

Caractères qualitatifs et quantitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain.

Contracep Fertil Sex 1984, 12 : 527-535.

[40] GOUGEON A.

Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results.

Hum Reprod 1986, 1 : 81-87.

[41] GOUGEON A.

Physiologie ovarienne.

Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Gynécologie, 30-A-05, 1998, 8p.

[42] GOUGEON G.

Cinétique de la croissance folliculaire dans l'ovaire humain.

La lettre de Gynécologie 1990, 118 : 18-34.

[43] GOSDEN RG.

Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles.

Hum Reprod 1990, 5 : 499-504.

[44] GOSDEN RG, et al.

Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice.

J Reprod Fertil 1994, 101 : 619-623.

[45] GOSDEN RG, AUBARD Y.

Transplantation of Ovarian and Testicular tissues.

Austin (Texas) : Landes, R G, 1996.

[46] GOSDEN RG, BAIRD DT, WADE JC, WEBB R.

Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C.

Hum Reprod 1994, 9 : 597-603.

[47] GOSDEN RG, RUTHERFORD AJ, NORFOLK DR.

Ovarian banking for cancer patients : transmission of malignant cells in ovarian grafts.

Hum Reprod 1997, 12 : 403-405.

[48] GOSDEN RG, SPEARS N.

Programed cell death in the reproductive system.

British Medical Bulletin 1997, 53 : 644-661.

[49] GREEN SH, SMITH AU, ZUCKERMAN S.

The number of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing.

J Endocrinol 1956, 13 : 330-345.

[50] GUNASENA KT, LAKEY JR, VILLINES PM, BUSH M, RAATH C, CRITSER ES, et al.

Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue.

Anim Reprod Sci 1998, 53 : 265-275.

[51] GUNASENA KT, LAKY JRT, VILLINES PM, CRITSER ES, CRITSER JK.

Allogenic and xenogenic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice.

Biol Reprod 1997, 57 : 226-231.

[52] GUNASENA KT, VILLINES PM, CRISTER ES, CRISTER JK.

Live birth after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries.

Hum Reprod 1997, 12 : 101-106.

[53] HARTSHORNE G, BARLOW A, CHILD T.

Immunocytogenetic detection of normal and abnormal oocytes in human fetal ovarian tissue in culture.

Hum Reprod 1999, 14 : 172-182.

[54] HOFFMAN JS, LAIRD L, BENADIVA C, DREISS R.

In vitro fertilization following conservative management of stage 3 serous borderline tumor of the ovary.

Gynecol Oncol 1999, 74 : 515-518.

[55] HOVATTA O, SILYE R, ABIR R, KRAUSZ T, WINSTON RL.

Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long term culture.

Hum Reprod 1997, 12 : 1032-1036.

[56] HWANG JL, LIN YN, TSAI YL.

Pregnancy after immature oocyte donation and intracytoplasmic sperm injection.

Fertil Steril 1997, 68 : 1139-1140.

[57] KROHN PL.

Transplantation of the ovary.

In : Lord Zuckerman, Weir BJ, eds. *The ovary*. 2nd ed. New-York, London : Academic press, 1977 : 101-128. Vol II.

[58] LEVITT GA, JENNEY MEM.

The reproductive system after childhood cancer.

Br J Obstet Gynecol 1998, 105 : 946-953.

[59] LIPSCHUTZ A.

Nouvelles recherches sur la transplantation d'ovaires conservés hors de l'organisme.

C R Soc Biol 1932, 11 : 1107-1108.

[60] LYNCH HT.

Genetic risk in ovarian cancer (editorial).

Gynecol Oncol 1992, 46 : 1-3.

[61] MARMOR D.

Effets gonadiques de la radiothérapie et de la chimiothérapie.

In: Aubard Y, Olivennes F, eds. *Fertilité après traitements anticancéreux*. Paris:

Masson, 1999 : 3-24.

[62] MARSHALL FHA, JOLLY WA.

Results of heteroplastic ovarian transplantation as compared with those produced by transplantation in same individual.

Quart J Exp Physiol 1908, 1 : 115-120.

[63] MARTIN XJB, GOLFIER F, ROMESTAING P, RAUDRANT D.

First case of pregnancy after radical trachelectomy and pelvic irradiation.

Gynecol Oncol 1999, 74 : 286-287.

[64] MEIROW D, BEN YEHUDA D, PRUS D, POLIACK A, SCHENKER JG, RACHMILEWITZ EA, et al.

Ovarian tissue banking in patients with Hodgkin's disease: is it safe ?

Fertil Steril 1998, 69 : 996-998.

[65] MEIROW D, FASOULITIS SJ, NUGENT D, SCHENKER JG, GOSDEN RG, RUTHERFORD AJ.

A laparoscopic technique for obtaining ovarian cortical biopsy specimens for fertility conservation in patients with cancer.

Fertil Steril 1999, 71 : 948-951.

[66] MULLER HJ.

Artificial transmutation of the gene.

Science 1927, 66 : 84-87.

[67] NEWTON H.

The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patients.

Hum Reprod Update 1998, 4 : 237-247.

[68] NEWTON H, AUBARD Y, RUTHERFORD A, SHARMA V, GOSDEN RG.

Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue.

Hum Reprod 1996, 11 : 1487-1491.

[69] NIH. National Institutes of Health consensus development conference

statement. Ovarian cancer : screening, treatment and follow-up.

Gynecol Oncol 1994, 55 : S4-S14.

[70] NISOLLE M, CASANAS-ROUX F, QU J, MOTTA P, DONNEZ J.

Histologic and ultrastructural evaluation of fresh-thawed human ovarian xenografts in nude mice.

Fertil Steril 2000, 74 : 122-129.

[71] NUGENT D, NEWTON H, GALLIVAN L, GOSDEN RG.

Protective effect of vitamine E on ischemia-reperfusion injury in ovarian grafts.

J Reprod Fertil 1998, 114 : 341-346.

[72] OKTAY K, AYDIN BA, ECONOMOS R, RUCINSKI J.

Restoration of ovarian function after autologous transplantation of human ovarian tissue in the forearm.

Fertil Steril 2000, 74 : 590 (abstr).

[73] OKTAY K, KARLIKAYA G.

Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue.

N Eng J Med 2000, 342 : 1919.

[74] OKTAY K, KARLIKAYA G, AYDIN BA

Ovarian transplantation now a reality ?

International Symposium on storing Reproduction. Bologna, 1999 : p. O23.

[75] OKTAY K, NEWTON H, GOSDEN R

Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth.

Fertil Steril 2000, 73 : 599-603.

[76] OKTAY K, NEWTON H, MULLAN J, GOSDEN RG.

Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone.

Hum Reprod 1998, 13 : 1133-1138.

[77] OKTAY K, NUGENT D, NEWTON H, SALHA O, CHATTERJEE P, GOSDEN RG.

Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue.

Fertil Steril 1997, 67 : 481-486.

[78] PAJOR A, ZIMONY I, ROZAKAMIA K.

Pregnancies and offspring in survivors of acute lymphoid leukemia and lymphoma.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1991, 40 : 1-5.

[79] PARKES AS.

Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue.

J Endocrinol 1958, 17 : 337-340.

[80] PARKES AS, SMITH AU.

Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperature.

Proc Roy Soc 1953, 14 : 455-470.

[81] PARKES AS, SMITH AU.

Storage of testicular tissue at very low temperature.

Brit Med J 1954, 1 : 315-316.

[82] PARROTT DMV.

Ovarian grafting as a method for reseach into ageing.

Gerontologia 1959, 3 : 91-93.

[83] PARROTT DMV.

The fertility of mice with orthotopic ovarian graft derived from frozen tissue.

J Reprod Fertil 1960, 1 : 230-241.

[84] PAYNE MA, MEYER RK.

Endocrine function of ovarian tissue after growth or storage in vitro.

Proc Soc Exp Biol NY 1942, 51 : 188.

[85] RADFORD JA, LIEBERMAN BA, BRISON DR, SMITH ARB, CRITCHLOW JD, RUSSEL SA, et al.

Orthotopic reimplantation of cryoperserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma.

Lancet 2001, 357 : 1172-1175.

[86] ROBERTSON JA.

Ethical issues in ovarian transplantation and donation.

Fertil Steril 2000, 73 : 443-446.

[87] ROY S, TREACY B.

Isolation and long-term culture of human preantral follicles.

Fertil Steril 1993, 59 : 783-790.

[88] SALLE B, LORNAGE J, DEMERCI B, VAUDOYER F, POIREL MT, FRANCK M, et al.

Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep.

Fertil Steril 1999, 72 : 366-370.

[89] SALLE B, LORNAGE J, FRANCK M, ISOARD L, RUDIGOZ RC, GUERIN JF.

Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment.

Fertil Steril 1998, 70 : 124-128.

[90] SHAW JM, BOWLES J, KOOPMAN P, WOOD EC, TROUNSON AO.

Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients.

Hum Reprod 1996, 11 : 1668-1673.

[91] SPEARS N, BOLAND NI, MURRAY AA, GOSDEN RG.

Mouse oocytes derived from in vitro grown primary ovarian follicles are fertile.

Hum Reprod 1994, 9 : 527-532.

[92] SPINELLI S, CHIODI S, BACIGALUPO A, BRASCA A, MENUA MV, PETTI AR, et al.

Ovarian recovery after total body irradiation and allogenic transplantation : long term follow-up of 79 females.

Bone Marrow Transplant 1994, 14 : 373-380.

[93] TEINTURIER C, HARTMANN O, VALTEAU-COUANET D, BENHAMOU E, BOUGNERES PF.

Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure.

Bone Marrow Transplant 1998, 22 : 989-994.

[94] TUFFIER T.

Etudes chirurgicales sur 230 greffes ovariennes.

Bull Acad Méd 1921, 86 : 99-105.

[95] WEISSMAN A, GOTLIEB L, COLGAN T, JURISICOVA A, GREENBLATT EM, CASPER RF.

Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse.

Biol Reprod 1999, 60 : 1462-1467.

[96] WITT KL, BISHOP JB

Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells.

Mutat Res 1996, 355 : 209.

[97] WRIGHT CS, HOVATTA O, MARGARA R.

Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of ovarian follicles.

Hum Reprod 1999, 14 : 1555-1562.

[98] WU J, ZHANG L, LIU P.

A new source of human oocytes : preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicles from follicular aspirates.

Hum Reprod 1998, 13 : 2561-2563.

[99] ZHANG J, LIU J, XU P.

Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova.

J Assist Reprod Genet 1995, 12 : 361- 368.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION..... | 10 |
| I – LA TECHNIQUE DE LA CRYOPRESERVATION DE TISSU OVARIEN..... | 12 |
| Le prélèvement du tissu ovarien et son conditionnement pour la congélation..... | 13 |
| • La voie d'abord..... | 13 |
| • Le conditionnement du tissu..... | 15 |
| ➤ Que faut-il congeler dans l'ovaire ?..... | 15 |
| ➤ Le conditionnement avant congélation..... | 16 |
| La congélation et la décongélation du tissu ovarien..... | 18 |
| • Histoire de la cryopréservation du tissu ovarien..... | 18 |
| • Le cryoprotecteur..... | 22 |
| • La décongélation..... | 25 |
| • Résultats généraux de la congélation-décongélation.... | 25 |
| L'utilisation du tissu ovarien..... | 26 |
| • L'autogreffe d'ovaire..... | 27 |
| ➤ L'autogreffe orthotopique de tissu ovarien..... | 28 |
| ➤ L'autogreffe hétérotopique de tissu ovarien..... | 30 |
| • La maturation folliculaire in vitro..... | 33 |
| • La xénogreffe..... | 36 |
| ➤ Revue des travaux réalisés sur la xénogreffe de tissu ovarien..... | 36 |
| ➤ Synthèse de ces différents travaux..... | 41 |
| ➤ Aspects éthiques de la xénogreffe..... | 44 |
| • L'allogreffe du tissu ovarien..... | 45 |

| | |
|---|------------|
| II- LES INDICATIONS DE LA CRYOPRESERVATION DE TISSU OVARIEN..... | 47 |
| Rappels physiologiques..... | 49 |
| • Multiplication des ovogonies..... | 49 |
| • Initiation méiotique..... | 51 |
| • Atrésie..... | 51 |
| • Folliculogénèse..... | 52 |
| • Ovulation..... | 58 |
| • Phase lutéale..... | 58 |
| A quoi pourrait servir la CPTO ?..... | 59 |
| • La destruction du stock folliculaire liée au temps..... | 61 |
| • Les situations pathologiques qui menacent le stock folliculaire..... | 62 |
| • Les menaces iatrogènes pour la réserve folliculaire..... | 66 |
| Les problèmes soulevés par la CPTO..... | 72 |
| • Le problème de l'âge..... | 72 |
| • Le problème de la quantité de tissu à collecter..... | 73 |
| • Le devoir d'information des patientes..... | 74 |
| • Les problèmes éthiques et législatifs..... | 75 |
| | |
| CONCLUSION..... | 76 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 78 |
| TABLE DES MATIERES..... | 97 |
| ABREVIATIONS..... | 99 |
| SERMENT D'HIPPOCRATE..... | 101 |

ABREVIATIONS

| | |
|-------------------|---|
| AMP : | Assistance Médicale à la Procréation. |
| BRCA : | Breast Cancer. |
| CCG : | Couche de Cellules de la Granulosa. |
| CHRU : | Centre Hospitalier Régional Universitaire. |
| CPTO : | Cryopréservation du Tissu Ovarien. |
| DMSO : | Dimethyl Sulphoxide. |
| DPL : | Début de la Phase Lutéale. |
| FIV : | Fécondation in vitro. |
| FSH : | Hormone folliculo-stimulante (Follicule Stimulating Hormone). |
| HCG : | Hormone gonadotrophine chorionique (Human Chorionic Gonadotrophin). |
| HPG : | Hypogonadique. |
| GnRH : | Gonadotrophines ou gonadostimulines. |
| LH : | Hormone lutéo-stimulante (Lutenizing Hormone). |
| MFIV : | Maturation Folliculaire In Vitro. |
| NOD-SCID : | Non Obese Diabetic - Severe Combined Immuno Deficient. |
| PBS : | Phosphate Buffered Saline. |
| SCID : | Severe Combined Immuno Deficient. |
| TOH : | Tissu Ovarien Humain. |
| XTO : | Xénogreffe du Tissu Ovarien. |

SERMENT
D'HIPPOCRATE

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 viole et que je parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 173.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME :

Les premiers essais de cryopréservation du tissu ovarien (CPTO) furent réalisés vers les années 1950. Chez la femme, la CPTO est déjà opérationnelle avec des taux de survie folliculaires permettant d'envisager des applications cliniques. Le problème réside dans l'obtention de la maturation des follicules primordiaux, seuls survivants après la décongélation. Parmi les trois possibilités dont nous disposons (autogreffe, maturation in vitro, xénogreffe), c'est l'autogreffe qui paraît la plus réalisable dans un avenir proche. Les premières tentatives d'autogreffe viennent d'être réalisées chez la femme. La CPTO permet de protéger la réserve folliculaire des menaces qui pèsent sur elle. La première de ces menaces est la destruction physiologique massive des follicules observée au cours du temps. La CPTO pourrait permettre d'éviter ce gaspillage repoussant ainsi l'âge de la ménopause au delà des limites naturelles. Toutes les situations conduisant à une ménopause précoce, si elles sont prévisibles, pourraient également bénéficier de la CPTO. La destruction des follicules observée après irradiation pelvienne ou traitement par les agents alkylants est une autre situation où la CPTO pourrait nous aider à préserver la fertilité des patientes. Parmi ces différentes indications, c'est la destruction iatrogène des follicules liée aux traitements du cancer qui pourrait dès aujourd'hui bénéficier de la CPTO. Les prélèvements chez la femme doivent encore rester rares et entrer dans le cadre de la recherche clinique.

ABSTRACT :

The first attempts at ovarian tissue cryopreservation (OTCP) were performed in the 1950 s. In women, OTCP is already operational with rates of follicular survival that permits envisioning clinical applications. The problem is obtaining the maturation of the primordial follicles, the only type which survive the thawing process. Among the three possibilities our disposal (autograft, in-vitro maturation, and xenograft), it is autografting that would seem most realisable in the near future. The first autografts have been reported recently. OTCP is the procedure designed to protect ovarian tissue from threats to its follicular reserves. The first threat is the time-related massive physiological destruction of the follicular reserve ending with menopause. OTCP would enable this wastage to be arrested, thereby prolonging ovarian cycling beyond limits. Conditions producing premature menopause, when known in advance, may also potentially benefit from OTCP. The iatrogenic destruction of the follicular reserve by radiation therapy or alkylating agents is another situation where OTCP could enable the patient's fertility to be preserved. Among these clinical settings, it is the iatrogenic destruction of follicular stocks that appears to us, with the current state of research, to even now be able to benefit from OTCP. In women, extracting such tissue needs to still remain infrequent and within the cadre of clinical research.

MOTS CLES : Cryopréservation du tissu ovarien – Fertilité.

KEYWORDS : Ovarian tissue freezing – Fertility.

JURY :

Président
Juges

: Monsieur le Professeur PHILIPPE.
: Madame le Professeur BORDESSOULE.
Monsieur le Professeur CLAVERE.
Madame le Professeur VIDAL.

Membres invités

: Monsieur le Docteur AUBARD.
Monsieur le Docteur POUGET
Monsieur le Docteur RAFFI.
