

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 2012

THESE N°

CULTURE IN VITRO DE CORTEX OVARIENS CRYOCONSERVES
ESSAI DE MISE AU POINT D'UN MODELE DE CULTURE AU SEIN
DU CHU DE LIMOGES

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 29 Juin 2012

par

Lorène DONADEL

Née le 19 octobre 1982, à Kourou

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur AUBARD	Président
Mme. le Professeur YARDIN.....	Juge
M. le Professeur VALLEIX.....	Juge
M. le Professeur DUMAS.....	Juge
M. le Docteur PIVER	Directeur de thèse



Le 01.09.2011

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Denis VALLEIX

ASSESEURS : Monsieur le Professeur Marc LASKAR
 Monsieur le Professeur Jean-Jacques MOREAU
 Monsieur le Professeur Pierre-Marie PREUX

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS :

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul (CS)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise (CS)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S.)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEDANE Christophe	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe (CS)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (CS)	O.R.L.
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (CS)	DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (CS)	HEMATOLOGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (CS)	RADIOETHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (CS)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
COGNE Michel (CS)	IMMUNOLOGIE

COLOMBEAU Pierre (SUR. 31.08.2014)	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe (C.S.)	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S.)	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel (CS)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe (C.S.)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (SUR. 31.08.2012)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FEISS Pierre (SUR. 31.08.2013)	ANESTHESIOLOGIE- REANIMATION
FEUILLARD Jean (CS)	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent (CS)	CHIRURGIE INFANTILE
FUNALOT Benoît	BIOCHIMIE et BILOGIE MOLECULAIRE
GAINANT Alain (C.S.)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (CS)	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S.)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (CS)	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE

MABIT Christian (CS)	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MAUBON Antoine (CS)	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
MELLONI Boris (CS)	PNEUMOLOGIE
MERLE Louis (CS)	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
MONTEIL Jacques (CS)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques (C.S.)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique (SUR. 31.08.2013)	CHIRURGIE INFANTILE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie (CS)	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile (CS)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves (C.S.)	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
SAUTEREAU Denis (CS)	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck (CS)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE , DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole (CS)	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel (SUR. 31.08.2014)	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE CHIRURGIE GENERALE

VERGNENEGRE Alain
(CS)

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE
DE LA SANTE et PREVENTION

VIDAL Elisabeth
(C.S.)

MEDECINE INTERNE

VIGNON Philippe

REANIMATION

VIROT Patrice
(CS)

CARDIOLOGIE

WEINBRECK Pierre
(C.S.)

MALADIES INFECTIEUSES

YARDIN Catherine
(C.S.)

CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

ANTONINI Marie-Thérèse
(CS)

PHYSIOLOGIE

BOURTHOMIEU Sylvie

CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

BOUTEILLE Bernard

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

CHABLE Hélène

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

DURAND-FONTANIER Sylvaine

ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)

ESCLAIRE Françoise

BIOLOGIE CELLULAIRE

FUZIER Régis

ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

HANTZ Sébastien

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

LAROCHE Marie-Laure

PHARMACOLOGIE CLINIQUE

LE GUYADER Alexandre

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE

MARIN Benoît

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et
PREVENTION

MOUNIER Marcelle

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE
HOSPITALIERE

PICARD Nicolas

PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

QUELVEN-BERTIN Isabelle

BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

TERRO Faraj

BIOLOGIE CELLULAIRE

VERGNE-SALLE Pascale

THERAPEUTIQUE

VINCENT François

PHYSIOLOGIE

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE**CAIRE** François

NEUROCHIRURGIE

P.R.A.G**GAUTIER** Sylvie

ANGLAIS

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**BUCHON** Daniel

MEDECINE GENERALE

BUISSON Jean-Gabriel

MEDECINE GENERALE

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**DUMOITIER** Nathalie

MEDECINE GENERALE

MENARD Dominique

MEDECINE GENERALE

PREVOST Martine

MEDECINE GENERALE

REMERCIEMENTS

Au président du jury

Monsieur le Professeur Yves AUBARD,

Professeur des Universités de Gynécologie-Obstétrique

Chirurgien des Hôpitaux

Chef de Service

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse

Je vous prie de recevoir toute ma considération

Au jury

Madame le Professeur Catherine YARDIN,

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Chef de Service

Ta disponibilité et tes conseils m'ont toujours été précieux

Merci d'avoir guidé mes premiers pas dans l'univers de la recherche

Monsieur le Professeur Denis VALLEIX,

Professeur des Universités d'Anatomie

Chirurgie générale

Chirurgiens des Hôpitaux

Votre écoute des étudiants et vos enseignements sont exemplaires

Votre présence parmi le jury m'honore

Monsieur le Professeur Jean-Philippe DUMAS,

Professeur des Universités d'Urologie

Chirurgien des Hôpitaux

Mon passage dans votre service est un excellent souvenir d'internat

Puisse que votre détermination à la chirurgie de qualité dans une ambiance de travail

agréable perdure

A mon directeur de thèse

Monsieur le Docteur Pascal PIVER,

Praticien hospitalier de Gynécologie-Obstétrique

CHU Limoges

Votre rigueur et votre exigence m'ont toujours donné envie de me dépasser

Travailler avec vous a été un honneur et une chance

Puissiez vous trouver dans cette thèse l'expression de mon admiration et de ma

reconnaissance

A Pierre,

A ma famille,

Merci de m'avoir soutenue depuis de si longues années

Malgré la vie qui passe nous serons toujours une famille unie

Je vous aime

A mes amis,

Proches ou loins vous êtes là, merci

A Florence

Au service de Gynécologie-Obstétrique

Aux laboratoires de PMA et de Cytogénétique

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des abbréviations

PRESERVATION DE LA FERTILITE – ETAT DES CONNAISSANCES

1. Indications de la préservation de la fertilité

1.1 LES CANCERS

1.1.1 Les chimiothérapies

1.1.2 La radiothérapie

1.1.3 La chirurgie

1.1.4 La préparation pré-greffe

1.1.5 Conclusion

1.2 LES AUTRES CAUSES D'INSUFFISANCE OVARIENNE PREMATUREE

1.2.1 Ovariectomie bilatérale

1.2.2 Maladies auto immunes

1.2.3 Maladies génétiques

2. Les techniques de préservation de la fertilité

2.1 LA TRANSPOSITION OVARIENNE

2.2 LES METHODES PHARMACOLOGIQUES

2.2.1 Les agonistes du GnRH : « la suppression ovarienne »

2.2.2 La contraception orale

2.2.3 Les inhibiteurs d'apoptose

2.2.4 L'acétate de médroxyprogestérone

2.3 LES METHODES MEDICALES D'ASSISTANCE A LA PRESERVATION DE LA FERTILITE

2.3.1 La cryopréservation embryonnaire

2.3.2 La cryopréservation ovocytaire

2.3.3 La cryoconservation tissulaire

3. La culture folliculaire in vitro : croissance et maturation folliculaire in vitro

3.1 MODELE MURIN : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

3.2 MODELE HUMAIN : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

3.2.1 La folliculogénèse humaine

3.2.2 Modèles de culture actuels

4. Objectifs de notre travail : essai de mise au point d'un modèle de culture folliculaire in vitro.

4.1 CHOIX DE L'ORIGINE DES CORTEX

4.2 CHOIX DE LA CULTURE AU SEIN DU CORTEX : ARCHITECTURE 3D VERSUS 2D

4.3 CHOIX DE TISSUS OVARIENS CONGELES OU FRAIS

4.4 CHOIX DES MILIEUX DE CULTURE

4.4.1 Milieu avec ou sans sérum humain

4.4.2 Apport de bpV (pic)

4.4.3 Apport d'activine A

4.4.4 Choix du milieu de culture basal

MATERIEL et METHODES

1. PATIENTE

2. CULTURES TISSULAIRES

2.1 CULTURE N° 1

2.2 CULTURE N° 2

2.3 CULTURE N° 3

2.4 OBTENTION DE SERUM DE SANG FŒTAL HUMAIN

2.5 OUTILS DE MESURE

2.6 METHODE D'ANALYSE

RESULTATS

1. Culture n°1

2. Culture n°2

3. Culture n°3

4. Comparaison des résultats

DISCUSSION

1. CULTURE n° 1

2. CULTURE n° 2

3. CULTURE n° 3

4. COMPARAISON des cultures

5. DISCUSSION générale

CONCLUSION

Annexe

Bibliographie

Table des matières

LISTE DES ABBREVIATIONS

α MEM : alpha Minimal Essential Medium

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

bpV : bisperoxovanadium

DMSO : DiMethylSulfoxide

EGF : Epidermal Growth Factor

FGF : basic Fibroblast Growth Factor

FIV : Fécondation In Vitro

FOXO3 : Forkhead box O3

FSH : Hormone FolliculoStimulante

GDF9 : Growth Differentiation Factor 9

GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

GnRH : Gonadotropine Releasing Hormone

HER : Human Epidermal growth factor Receptor

HMG : Human Menopause Gonadotrophin

HES : Hématéine Eosine Safran

HSA : Human Serum Albumin

ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection

IGF : Insulin-like Growth Factor

ITS : Insulin Transferrin Selenium

LH : Hormone Lutéinisante

PCR : Polymerase Chain Reaction

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

TGF : Transforming Growth Factor

VEGF : vascular endothelial growth factor

VG : Vésicule germinale

INTRODUCTION

En 1996, Eppig et O'Brien rapporte la première naissance d'une souris vivante obtenue par croissance et maturation folliculaire in vitro d'ovocytes primordiaux (Eppig and O'Brien, 1996). L'intérêt de la recherche à propos de la culture folliculaire in vitro est lancée.

En 2008, l'équipe de Telfer publie l'obtention de follicules antraux humains, à partir de follicules primordiaux au sein de cortex ovariens vitrifiés, après une durée totale de culture de 10 jours et après isolation des follicules secondaires au sixième jour de culture (Telfer et al., 2008).

Entre ces deux publications des progrès scientifiques ont été faits, mais aucune naissance humaine n'a eu lieu dû fait de difficultés techniques et éthiques.

Ces recherches sont nées de la prise de conscience de la nécessité de préserver la fertilité chez la femme après des traitements stérilisants et la nécessité de mettre au point des techniques sans risquer de réintroduire la maladie initiale.

En effet les progrès majeurs des thérapeutiques anti-cancéreuses cette dernière décennie ont augmenté les taux de survie des patients, notamment en ce qui concerne les enfants atteints de cancer, chez qui le taux de survie global atteint les 75%.

Ces guérisons sont rendues possibles par l'intensification des traitements anti-cancéreux et se font donc souvent au détriment de la fonction reproductrice de ces jeunes adultes. Grâce à ces thérapeutiques de plus en plus efficaces, la survie n'est plus le seul objectif, la qualité de vie après la guérison devient une préoccupation essentielle.

Ces évolutions étant relativement récentes, les différentes solutions envisagées pour préserver la fertilité de ces patientes sont pour la plupart encore de l'ordre de la recherche.

Chez l'homme post-pubère la préservation de la fertilité est assez simple, en effet le spermatozoïde est une cellule produite tout au long de la vie, il est facile à congeler et résiste bien à la décongélation. La cryopréservation de paillettes est ainsi proposée en pratique courante aux hommes devant subir un traitement potentiellement stérilisateur.

Le problème est différent chez la femme chez qui le stock folliculaire est fixe et limité dès la naissance et chez qui la cryopréservation de cellule ou de tissu de la reproduction est plus difficile.

Différentes solutions peuvent être envisagées, selon que l'on s'adresse à une enfant ou à une femme, selon que cette femme ait un partenaire au moment du diagnostic de la maladie ou non et selon la possibilité de bénéficier d'un délai avant la mise en route du traitement ou non.

Ainsi à l'heure actuelle, on peut proposer aux femmes nécessitant une préservation de leur fertilité la cryoconservation d'embryons, la cryoconservation d'ovocytes matures ou immatures et la cryoconservation de tissus ovariens.

Parmi ces possibilités, la culture in vitro de cortex ovariens frais ou cryoconservés présente plusieurs avantages pratiques puisqu'elle peut être proposée à tout âge, que le prélèvement peut être effectué très rapidement sans retarder le traitement anti-cancéreux et puisque les procédés de congélation et décongélation de tissu ovarien sont actuellement bien codifiés avec un bon

rendement en terme de survie ovocytaire. Par contre, comme cette technique n'est actuellement pas aboutie chez la femme.

Nous verrons que des discussions persistent en ce qui concerne le lieu de la culture du follicule : au sein du cortex ovarien ou en matrice 3D après isolation ; en ce qui concerne l'utilisation de cortex ovariens frais ou congelés ; en ce qui concerne l'utilisation de milieux de cultures continus ou séquentiels en fonction du stade folliculaire ; en ce qui concerne l'utilisation ou non de sérum humain dans les milieux de culture ; en ce qui concerne l'application de cultures accélérées ou prolongées ou encore en ce qui concerne la définition des marqueurs de « normalité » des complexes issus des cultures.

De plus la recherche sur la culture folliculaire in vitro soulève des questionnements éthiques importants : origine des cortex ovariens humains mis en culture, possibilité ou non de fécondation des ovocytes matures obtenus, ...

Nous verrons que plusieurs modèles animaux ont été utilisés dans la recherche sur la culture folliculaire in vitro et qu'ils ont pu faire progresser les techniques aujourd'hui envisageables chez la femme.

La culture folliculaire in vitro reste donc du domaine de la recherche compte tenu des difficultés techniques et éthiques.

Plusieurs protocoles de culture folliculaire ont été mis au point et testé au CHU de Limoges. Nous exposerons les hypothèses scientifiques à l'origine de ces cultures et les résultats obtenus.

PRESERVATION DE LA FERTILITE – ETAT DES CONNAISSANCES

1. INDICATIONS DE LA PRESERVATION DE LA FERTILITE

Les étiologies des insuffisances ovariennes prématurées les plus fréquentes sont iatrogènes : chimiothérapie et radiothérapie, les autres étiologies sont plus rares.

1.1 Les cancers

Les progrès considérables réalisés dans le traitement des cancers ont permis d'augmenter la survie à long terme des patients. Par exemple, pour tous les cancers confondus chez les femmes, la survie à 5 ans est passée ces 25 dernières années de 56 à 64 %. La survie à 5 ans du cancer du sein approche de nos jours les 85 % (Institut National du Cancer).

Selon les statistiques les cancers les plus fréquents chez les femmes de moins de 40 ans sont le cancer du sein (0,48%), les mélanomes cutanés (0,21%), les cancers du col utérin (0,16%), les leucémies (0,13%), les lymphomes non hodgkiniens (0,09%) et les cancers de l'endomètre (0,06%).

Ainsi le risque d'insuffisance ovarienne post traitement, selon Meiorow en 2000, chez des patientes d'âge moyen de 29 ans est de 15% pour une leucémie aiguë myéloïde, de 44 % pour un lymphome non hodgkinien, de 32 % pour un lymphome de Hodgkin et de 50 % pour un cancer du sein (Meiorow, 2000).

Les traitements actuels comprenant des chimiothérapies combinées notamment quand elles contiennent des agents alkylants, parfois associées à la radiothérapie ont comme principal effet secondaire au long cours d'entraîner une insuffisance ovarienne précoce.

La préservation de la fertilité chez ces femmes doit être prise en compte de façon multidisciplinaire et précocement discuté après le diagnostic de cancer avec chaque patiente.

De nombreuses études ont été réalisées in vitro et in vivo concernant les effets des différentes chimiothérapie et de la radiothérapie sur les ovaires, on sait donc assez bien prévoir quelles patientes seront à risque d'insuffisance ovarienne ; l'âge de la patiente étant le principal facteur pronostique puisqu'il reflète l'état de la réserve ovarienne.

1.1.1 Les chimiothérapies

Les chimiothérapies sont classées en cinq grandes classes selon leur mode d'action : les agents alkylants, les aneuploïdants, les inhibiteurs de la topo isomérase II, les antimétabolites et les radiomimétiques. L'insuffisance ovarienne occasionnée, son intensité et sa non réversibilité dépendent du type d'agent, de la dose administrée et de l'âge auquel la patiente reçoit ce traitement.

On a pu classer les drogues cytotoxiques selon le risque d'atteinte ovarienne plus ou moins sévère qu'elles entraînent, comme le montre le tableau ci-dessous :

Tableau 1. Classification des chimiothérapies en fonction du risque d'insuffisance ovarienne

Haut risque	Risque modéré	Risque faible
Cyclophosphamide	Cisplatine	Vincristine
Ifosfamide	Carboplatine	Methotrexate
Chlorméthine	Doxorubicine	Dactinomycine
Busulfan		Bléomycine
Melphalan		Mercaptopurine
Procarbazine		Vinblastine
Chlorambucil		

Il faut noter que la contribution relative de chaque drogue à l'insuffisance ovarienne est difficile à déterminer, puisque les chimiothérapies sont quasiment toujours administrées de façon combinée.

Certaines études ont tout de même mis en évidence les effets gonadotoxiques de certaines drogues : les agents alkylants, le cisplatine et analogues, et les alcaloïdes. Si toutes détruisent les follicules en croissance, les alkylants atteignent également les follicules primordiaux.

Toutes ces chimiothérapies sont également reconnues pour entraîner des dommages chromosomiques ou géniques sur les follicules, ce qui augmente le risque d'avortement spontané précoce ou de malformation fœtale, et ce qui incite donc à respecter un délai entre fin de chimiothérapie et conception.

Ensuite une relation dose effet a été montrée sur l'insuffisance ovarienne (Meirow, 2000).

Enfin, plus la patiente est âgée au moment du traitement, plus la toxicité de la chimiothérapie sera importante, avec notamment apparition d'une insuffisance ovarienne pour des doses moindres de toxiques. Ces résultats sont probablement dûs au fait que les femmes plus âgées présentent avant la chimiothérapie une réserve folliculaire plus faible.

Il semble aussi que les chimiothérapies altéreraient la qualité et les échanges des cellules ovocytaires et folliculaires ; et que les ovocytes survivants après chimiothérapie semblent être plus soumis au phénomène d'atrésie (Familiari et al., 1993).

1.1.2 La radiothérapie

La radiothérapie détruit préférentiellement les follicules primordiaux. Les ovaires sont exposés à la toxicité directe des irradiations quand la radiothérapie est utilisée pour traiter des pathologies pelviennes ou abdominales, et indirecte en cas d'irradiation de la base du crâne pour des tumeurs malignes du système nerveux central en interrompant l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Le degré d'atteinte de la fonction ovarienne dépend de la dose utilisée, du fractionnement de cette dose, du champ d'irradiation et de l'âge de la patiente.

L'effet dose dépendant a été démontré chez la souris par Gosden en 1997. De hautes doses de radiothérapie entraînent une déplétion totale de la réserve de follicules primordiaux et donc à terme une insuffisance ovarienne complète alors que des doses plus faibles permettent la survie d'un certain nombre de ces follicules (Gosden et al., 1997). En revanche le fait de fractionner la dose de rayon permet de diminuer leur toxicité.

Dans la plupart des cas on limite au maximum l'irradiation directe des ovaires, mais dans d'autres cas c'est impossible, notamment dans le cadre des irradiations corporelles totales ou dans le traitement des lymphomes de Hodgkin où les ganglions pelviens sont irradiés selon un champ en Y inversé.

La dose de rayons entraînant une insuffisance ovarienne complète à la fin du traitement est plus faible quand l'âge de la patiente augmente ; ainsi Wallace a démontré que cette dose était de 20.3 Gy à la naissance, de 18.4 Gy à l'âge de 10 ans, de 16.5 Gy à l'âge de 20 ans et de 14.3 Gy à l'âge de 30 ans (Wallace et al., 2005).

Les risques des traitements anti cancéreux sur le produit de conception à venir sont également à prendre en considération. En effet le maintien ou la récupération de la fertilité après traitement cytotoxique pose le délicat problème du risque d'altérations chromosomiques ou géniques des gamètes avec les conséquences sur le produit de conception : avortements spontanés précoces, mort fœtale in utero, retard de croissance, malformations congénitales, maladies génétiques à expression retardée. D'une façon générale on recommande pour les deux sexes une période d'attente de six mois à un an après exposition aux traitements afin que la fécondation n'ait pas lieu avec des gamètes ayant subi leur maturation au cours de la période d'exposition.

Le risque mutagène existe vraisemblablement comme le suggèrent les données animales mais il est difficile à mettre en évidence dans l'espèce humaine.

Les données rapportées sur les enfants nés de parents traités par des agents cytotoxiques ne démontrent pas une augmentation significative du nombre de malformations congénitales mais les études ne permettent pas non plus de conclure à une innocuité, surtout en ce qui concerne les effets éventuels à long terme des mutations sur l'apparition de cancers ou de maladies génétiques dans la descendance.

1.1.3 La chirurgie

Pour les cancers gynécologiques une approche chirurgicale conservatrice peut être proposée si elle est raisonnable sur le plan carcinologique pour la survie de la patiente. C'est le cas dans les premiers stades des cancers du col, carcinomes vaginaux et carcinomes vulvaires, ainsi que dans les tumeurs ovariennes de bas grade et dans certains cas de carcinomes ovariens unilatéraux.

En France, où la loi n'autorise pas le recours à une mère porteuse, la question de la préservation de la fertilité ne se pose que lorsque la chirurgie n'est pas délétère pour les organes génitaux.

1.1.4 La préparation pré-greffe

La greffe de moelle ou la greffe de cellules souches hématopoïétiques fait partie de l'arsenal thérapeutique des hémopathies.

La préparation avant greffe comprend une chimiothérapie intensive et/ou une irradiation corporelle totale permettant de réduire les risques de rejet de greffe.

Cette association constitue le traitement présentant le plus de risque d'insuffisance ovarienne précoce, ainsi Meirow publie en 2000 un taux de récupération de la fonction endocrine à 5 ans de 8% chez des femmes jeunes ayant subi une radio chimiothérapie avant une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Meirow, 2000).

Le protocole de chimiothérapie habituellement utilisé dans cette indication est une association de busulfan et cyclophosphamide, les taux d'insuffisance ovarienne décrits dans les études avec ce protocole sont de l'ordre de 100%.

La greffe de cellules souches hématopoïétique n'est plus seulement réservée au traitement des hémopathies malignes, elle est aussi utilisée pour traiter des maladies hématologiques bénignes graves comme la drépanocytose, la thalassémie majeure ou l'anémie aplasique et certaines maladies auto-immunes ne répondant pas aux immunosuppresseurs comme certains lupus ou thrombocytopénies auto-immunes.

Ces études montrent l'extrême toxicité des protocoles pré greffe qui entraînent des anomalies de développement sexuel et de croissance chez les enfants et des

infertilités chez l'adulte, ces cas doivent donc impérativement faire l'objet de méthode de préservation du capital folliculaire.

1.1.5 Conclusion

Il existe des variations inter individuelles importantes des effets secondaires de ces traitements, ce qui empêche de dire si une jeune femme souffrira ou non d'une insuffisance ovarienne après tel ou tel traitement.

Une aménorrhée post chimiothérapie est définitive si elle persiste plus de six mois après la fin du traitement, mais il existe des cas décrits de reviviscence ovarienne à distance et des grossesses spontanées ont été rapportées chez des femmes en aménorrhée secondaire après chimio ou radio thérapie (Salooja et al., 1994)(Menashe et al., 1996).

Une FSH régulièrement élevée n'a donc pas de valeur prédictive absolue chez ces patientes.

D'autre part une reprise des cycles à la fin du traitement n'empêche pas la survenue à plus long terme de troubles du cycle, d'élévation de la FSH et d'une insuffisance ovarienne précoce.

Dans une revue de la littérature publiée en 2005, Wallace a établi une classification parmi les cancers les plus fréquents chez l'enfant et l'adolescent en fonction du risque de provoquer une hypofertilité et en tenant compte de la pathologie et de ses traitements (Wallace et al., 2005).

Tableau 2. Classification des cancers en fonction du risque d'infertilité.

Risque faible d'hypofertilité < 20%	Risque moyen d'hypofertilité	Risque élevé d'hypofertilité > 80%
Leucémie aigue lymphoblastique	Leucémie aigue myéloblastique	Irradiation corporelle totale
Tumeur de Wilms	Ostéosarcome	Radiothérapie localisée sur les gonades
Sarcome des tissus mous de stade 1	Sarcome des tissus mous de stade 2 et 3	Sarcome des tissus mous métastatique
Tumeurs des cellules germinales (en l'absence de radiothérapie et en préservant les gonades)	Sarcome d'Ewing non métastatique	Sarcome d'Ewing métastatique
Rétinoblastome	Neuroblastome	Chimiothérapie pré-greffe de moelle
Tumeurs du SNC en cas de chirurgie seule ou d'irradiation craniale < 24 Gy	Tumeurs du SNC en cas d'irradiation craniale > 24 Gy ou d'irradiation de la tige pituitaire	Maladie de Hodgkin si utilisation d'agents alkylants
	Hépatoblastome	
	Lymphome non Hodgkinien	
	Maladie de Hodgkin (si chimiothérapie alternative)	

1.2 Les autres causes d'insuffisance ovarienne prématurée

1.2.1 Ovariectomie bilatérale

Les indications sont limitées chez les patientes en âge de procréer, il peut s'agir notamment d'une endométriose sévère ou d'une ovariectomie prophylactique chez une femme à risque génétique élevé de développer une néoplasie ovarienne.

1.2.2 Maladies auto immunes

Certaines pathologies auto-immunes notamment le Lupus sévère, la glomérulonéphrite, la maladie de Behçet, la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Wegener, font appel dans leurs traitements à l'utilisation du cyclophosphamide dont la toxicité gonadique est reconnue.

1.2.3 Maladies génétiques

La maladie la plus fréquemment pourvoyeuse d'insuffisance ovarienne prématurée est le syndrome de Turner. C'est l'anomalie chromosomique la plus fréquente avec une incidence de 1 sur 2000 naissances de fille vivante.

Elle est caractérisée par une monosomie totale 45X ou partielle (mosaïque) au niveau de la paire des chromosomes sexuels. Son phénotype comprend notamment une insuffisance ovarienne précoce : le stock folliculaire est normal à la naissance mais il disparaît rapidement et précocement.

Ces patientes présentent donc une absence de développement des caractères sexuels secondaires, une aménorrhée et une infertilité.

Le traitement consiste le plus souvent en un traitement hormonal prolongé, dont on connaît les risques notamment carcinogènes, et qui ne règle pas le problème de la fertilité.

Deux tiers des patientes ne développeront pas de puberté spontanément et 95 % seront infertiles en l'absence de traitement.

Pourtant on trouve des follicules chez 50 % des patientes, le plus souvent en cas de mosaïque génétique, ce qui permettrait d'envisager chez ces patientes une

restauration de la sécrétion hormonale et une fertilité par prélèvement puis greffe ovarienne.

2. LES TECHNIQUES DE PRESERVATION DE LA FERTILITE

Etant donné les progrès réalisés dans le traitement des cancers, la préservation ou la restauration d'une fonction ovarienne et reproductive chez les femmes guéries d'un cancer est une question d'actualité.

Les options thérapeutiques sont bien sûr très différentes selon l'âge, le statut marital et le type de cancer et ses nécessités thérapeutiques.

Les seules techniques utilisées couramment sont la transposition ovarienne, qui a ses limites comme nous le verrons, et la congélation d'embryon qui n'est malheureusement pas utilisable pour des patientes pré-pubères ou n'ayant pas de partenaire ou chez lesquelles la chimiothérapie ne peut pas être retardée.

Pour ces groupes de patientes qui représentent la majorité des cas les possibilités thérapeutiques sont de l'ordre de la recherche, mais les équipes scientifiques et médicales ont saisi l'importance du problème et de nombreuses études ont été publiées ou sont en cours pour leur proposer des solutions.

Nous envisagerons dans ce chapitre les différentes alternatives proposées avant de développer en détail la technique qui nous intéresse : la croissance folliculaire in vitro.

2.1 La transposition ovarienne

Cette technique peut être utilisée dans les maladies de Hodgkin lorsque la radiothérapie en Y est indiquée, les cancers du col et du vagin et les sarcomes pelviens.

Elle consiste à déplacer les ovaires en conservant les pédicules vasculaires pour les mettre en dehors du champ de radiothérapie, la transposition peut être rétro-utérine, rétro-iliaque ou latéro-colique. Elle diminue significativement la dose de rayonnement reçue par les ovaires et donc le risque d'insuffisance ovarienne.

Chambers en 1990 étudie l'efficacité de la transposition ovarienne au dessus de la crête iliaque dans les cancers du col : 100 % des ovaires transposés conservent une fonction hormonale contre 0 % des ovaires non transposés (Chambers et al., 1990).

Bien entendu cette technique ne protège en aucun cas les follicules des effets toxiques des chimiothérapies et elle est inutilisable en cas de radiothérapie corps entier avant une greffe de cellules souches.

Les taux de grossesses retrouvées après transposition ovarienne sont de l'ordre de 10-15% (Gaetini et al., 1988).

2.2 Les méthodes pharmacologiques

L'hypothèse de départ serait que la mise au repos des ovaires avant et pendant un traitement par radio chimiothérapie, par blocage de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique par des analogues du GnRH ou des oestro-progestatifs, serait susceptible de conférer une certaine protection pour la fertilité à venir.

2.2.1 Les agonistes du GnRH : « la suppression ovarienne »

Il s'agit d'une méthode de prévention « in situ » des altérations de la fonction gonadique par les traitements anti-cancéreux. Ils limiteraient le nombre de follicules en croissance en bloquant la sécrétion de FSH et LH, permettant ainsi de les soustraire aux effets gonadotoxiques des chimiothérapies. Cette option est pourvoyeuse de nombreux effets indésirables connus : bouffées de chaleur, sécheresse vaginale, insomnies, chez des patientes sous chimiothérapie dont la qualité de vie est déjà altérée.

Par contre dans certaines situations, telles que les préparations pré-greffe où le risque d'aplasie médullaire est important, l'aménorrhée engendrée par les agonistes de la GnRH peut être recherchée.

Aux vus des résultats divergents des études, l'utilisation des agonistes de la GnRH en cours de chimiothérapie dans le but de préserver la fonction ovarienne est en cours d'évaluation.

2.2.2 La contraception orale

Des études ont cherché à montrer l'efficacité d'une pilule oestro-progestative permettant de bloquer l'axe hypothalamo-hypophysaire et donc de mettre les ovaires au repos ce qui les rendraient moins sensibles aux chimiothérapies.

2.2.3 Les inhibiteurs d'apoptose

La toxicité des chimiothérapies sur les follicules serait due à une accélération ou une augmentation de l'apoptose physiologique de ces cellules.

Des équipes se sont donc logiquement penchées sur l'effet protecteur potentiel d'anti-apoptotiques tels que la sphingosine 1-phosphate.

Cette dernière molécule protège les follicules de souris exposés à des doses de doxorubicine et à des rayonnements selon les études de Morita et de Paris (Morita et al., 2000) (Paris et al., 2002).

Mais ces études en sont encore à un stade expérimental et ne permettent pas de proposer ces traitements aux patientes.

2.2.4 L'acétate de médroxyprogestérone

Familiari a utilisé cet agent in vitro et lui a trouvé un potentiel effet protecteur des follicules primordiaux contre la toxicité des chimiothérapies (Familiari et al., 1993).

Mais cet agent semble altérer la qualité du complexe ovocyte-follicule et entraîner à plus long terme des atrésies précoces.

2.3 Les méthodes médicales d'assistance à la préservation de la fertilité

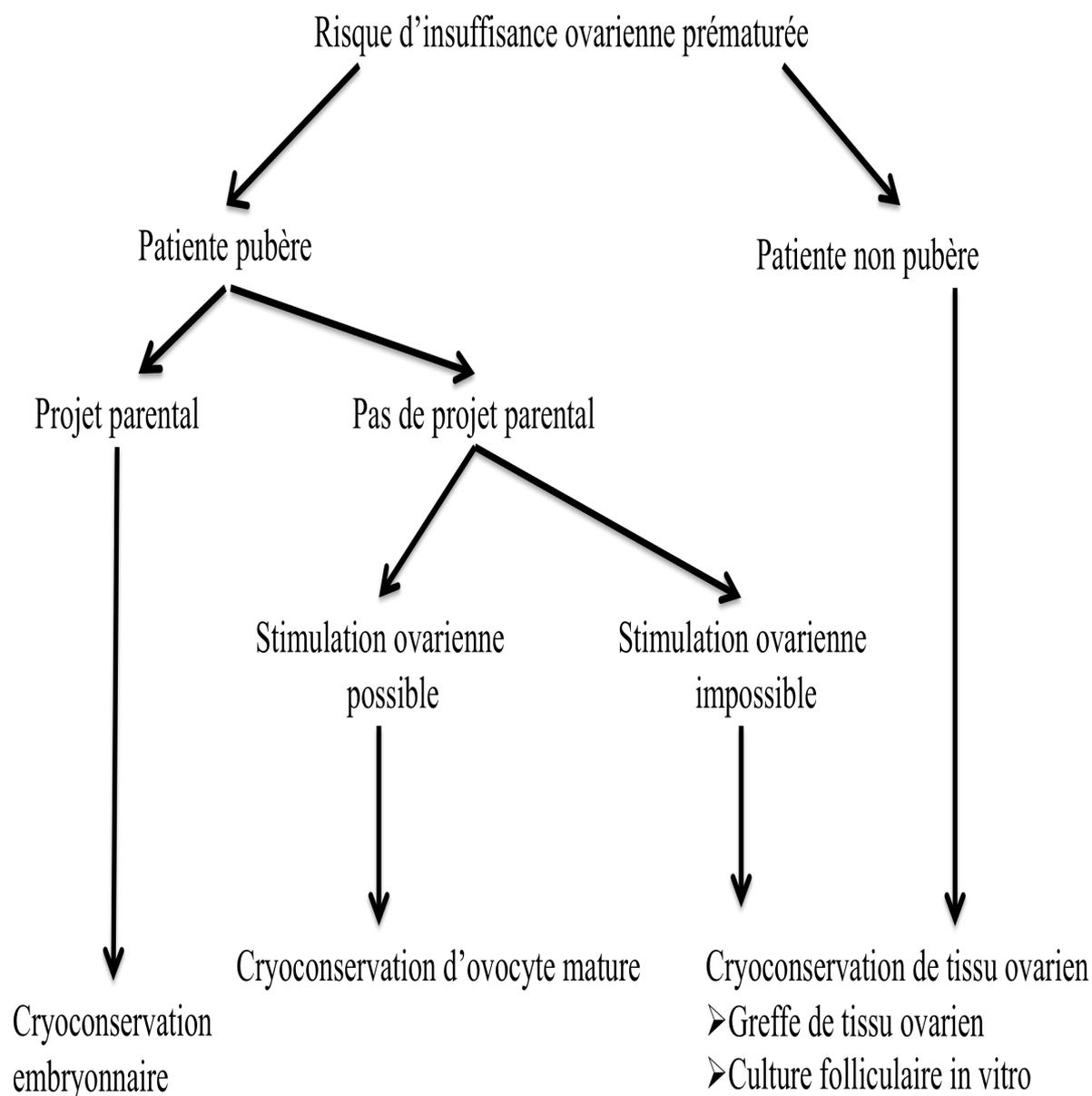


Figure 1. Possibilités de préservation de la fertilité

2.3.1 La cryopréservation embryonnaire

Cette technique représente actuellement la technique de préservation de la fertilité la mieux établie. La première grossesse issue d'un transfert d'embryon congelé a été obtenue par Trounson et Mohr en 1983 (Trounson and Mohr, 1983). Son utilisation depuis plus de vingt ans en préservation de la fertilité mais aussi et surtout dans le cadre des couples infertiles pris en charge en fécondation in vitro, fait de cette technique la technique la plus maîtrisée : l'embryon résiste bien à la cryoconservation ; la plus sûre : innocuité démontrée ; et la plus accessible : tous les centres d'assistance médicale à la procréation peuvent la proposer.

Le taux de survie des embryons post décongélation varie de 35 à 90 % et leur taux d'implantation de 8 à 30%. Le taux de naissances vivantes par transfert d'embryon congelé varie de 18 à 20%. Si on obtient plusieurs embryons lors de la fécondation in vitro, le taux cumulatif de grossesse peut aller jusqu'à 60%.

Elle est néanmoins utilisable uniquement chez des femmes en âge de procréer et en couple puisqu'il s'agit de réaliser chez ces patientes une technique de fécondation in vitro puis de congeler les embryons ainsi obtenus.

Si le nombre d'embryons congelés est suffisant, cette technique donne au couple la possibilité d'envisager plusieurs grossesses.

Par contre cette prise en charge nécessite un délai de 2 à 3 semaines avant le début du traitement gonadotoxique afin d'effectuer la stimulation ovarienne et le recueil des ovocytes. Ce délai n'est parfois pas envisageable, c'est pourquoi certains auteurs ont proposé dans ce cas de différer la ponction entre deux cures ou à la première phase de rémission ; se posent alors les problèmes de

diminution du stock folliculaire par les traitement entrepris et de qualité ovocytaire après chimiothérapie avec les risques chromosomiques engendrés.

Dolmans en 2005 a clairement démontré les mauvais résultats d'une FIV même après seulement une ou deux cures de chimiothérapie (Dolmans et al., 2005).

Enfin, cette technique est inutilisable quand la stimulation peut être dangereuse pour la patiente, c'est le cas par exemple pour des cancers du sein oestrogéno-dépendants : les forts taux d'oestrogènes sanguins peuvent stimuler la croissance des cellules cancéreuses. Chez ces patientes des stimulations par tamoxifène ou inhibiteurs de l'aromatase sont alors envisageables mais moins efficaces que les stimulations conventionnelles.

2.3.2 La cryopréservation ovocytaire

Elle représente une autre alternative à la préservation de la fertilité féminine. Depuis quelques années elle bénéficie d'un important intérêt en raison de l'alternative qu'elle représente à la cryoconservation embryonnaire et à certains problèmes légaux, moraux et religieux.

La cryoconservation ovocytaire ne nécessite ni chirurgie, ni partenaire, et fait appel à des protocoles de stimulation ovarienne utilisés en fécondation in vitro depuis plus de vingt ans.

La première naissance après cryoconservation ovocytaire a été rapportée en 1986 par Chen à partir d'un ovocyte mature (Chen, 1986). Depuis une centaine d'enfants sont nés après utilisation de cette technique.

L'ovocyte peut être conservé soit au stade mature bloqué en métaphase II ; mais cette cellule est extrêmement fragile vis à vis de la congélation décongélation ; soit au stade immature de vésicule germinale (VG) dont le taux de survie est

meilleur après décongélation. Cependant même si les taux de survie des ovocytes au stade de VG sont meilleurs, la faible efficacité des protocoles de maturation in vitro aboutit à un nombre final d'ovocytes matures utilisables inférieurs à celui obtenu avec la congélation-décongélation d'ovocytes en métaphase II.

2.3.2.1 Ovocyte en métaphase II

Cet ovocyte est une cellule très sensible à la cryopréservation, probablement à cause de la fragilité du fuseau méiotique de métaphase II.

Les autres désavantages de cette méthode sont que la patiente ne peut le plus souvent bénéficier que d'un cycle de stimulation et d'une ponction ovocytaire avant de subir les traitements potentiellement stérilisateurs. Or, on sait que le succès de la méthode dépend étroitement du nombre d'ovocytes recueillis ; de plus cette méthode n'est pas non plus applicable à des jeunes filles pré-pubères chez lesquelles la stimulation ovarienne n'est pas réalisable.

Le problème de retard à la mise en route du traitement anti-cancéreux est le même que pour la congélation embryonnaire.

Le taux de naissances vivantes par ovocyte II cryopréservé décongelé est de 1,6 % (Oktay et al., 2006), nettement inférieur au taux de naissances obtenu à partir d'ovocytes II frais : 6,6%.

Une nouvelle technique de cryoconservation : la vitrification vient d'être autorisée par la loi. Elle prévient la formation de cristaux de glace intracellulaire en utilisant une méthode de congélation ultra-rapide et des concentrations importantes de cryoprotecteurs. Dans l'étude de Rienzi en 2010, le taux de grossesse par ovocyte II vitrifié décongelé était de l'ordre de 16 % ; ce

qui n'était pas significativement différent de leur taux de grossesse par ovocyte II frais (Rienzi et al., 2010).

2.3.2.2 Ovocytes immatures

Etant donné la fragilité du fuseau méiotique, certains auteurs ont envisagé de congeler des ovocytes immatures au stade de vésicule germinative, stade auquel le noyau est en prophase I avec une chromatine diffuse enveloppée dans une membrane nucléaire, ce qui garantit probablement le respect de l'intégrité du capital génétique.

Ces cellules sont également plus résistantes à la congélation du fait de leur petit volume cellulaire.

Ces ovocytes sont récoltés après ponction de follicules non stimulés avant l'émergence du follicule dominant (follicules de 8-10 mm de diamètre). Cette ponction peut donc être réalisée chez des enfants et ne présente pas le délai et les effets secondaires d'une stimulation ovarienne.

Cette technique nécessite la maturation des ovocytes après décongélation et avant fécondation pour les faire évoluer jusqu'en métaphase II : c'est la technique de maturation folliculaire in vitro, qui est à l'étude dans plusieurs équipes.

Cette technique a pour but de réinitialiser et de compléter la première division méiotique du stade de vésicule germinative au stade de métaphase II, cette évolution nucléaire doit s'accompagner d'une maturation cytoplasmique pour la fécondation et les premières phases du développement embryonnaire. Cette coordination entre la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique rend la technique de maturation in vitro particulièrement difficile à réaliser.

Tucker a publié en 1998 une naissance vivante chez une femme après une grossesse obtenue par FIV à partir d'un ovocyte congelé au stade de vésicule germinative et mûri in vitro (Tucker et al., 1998). Mais cette naissance, comme celles obtenues après maturation in vitro (environ 300 naissances) provenaient de maturations de follicules frais, ponctionnés à des stades immatures chez des patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques ou chez des patientes mauvaises répondeuses en FIV, et non chez des patientes atteintes d'une néoplasie ayant cryoconservés leurs ovocytes au stade immature.

Quoiqu'il en soit les taux de grossesse après maturation in vitro restent très inférieurs à ceux obtenus en FIV/ICSI conventionnelle.

Selon une revue de la littérature publiée par Kim en 2006, la cryopréservation d'ovocytes immatures reste pour l'instant de l'ordre de la recherche et ne pourra être envisageable en pratique qu'avec l'avènement de techniques solides de maturation in vitro (Kim, 2006).

2.3.3 La cryoconservation tissulaire

La congélation de tissus ovarien constitue une alternative aux autres méthodes de préservation de la fertilité en ne retardant pas la mise en route des traitements et en s'adressant aussi bien aux enfants qu'aux femmes jeunes. Elle permet de conserver un nombre important de follicules primordiaux, seules cellules gonadiques survivant à la congélation, avant que les traitements gonadotoxiques ne les détruisent.

A partir de 1996 les travaux de Newton, de Gosden et de Aubard, ont montré la possibilité de congeler du tissu ovarien humain avec survie des follicules primordiaux (Newton et al., 1996)(Aubard et al., 1996). Depuis, la congélation

et le stockage de tissu ovarien humain fait partie des possibilités techniques retenues sérieusement face à l'enjeu que représente la préservation de la fertilité. En 2004, la loi de bioéthique en France a permis la réalisation des congélations de tissus ovariens en dehors des protocoles de recherche. Elle indique qu'en vue de la réalisation ultérieure d'une assistance médicale à la procréation, toute personne peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou du tissu germinale lorsqu'une prise en charge médicale est susceptible d'altérer sa fertilité.

En pratique, une ovariectomie ou des biopsies ovariennes sont réalisées par coelioscopie. Le transport au laboratoire doit être rapide dans une solution de conservation à 4°C. L'intervalle de temps entre la dévascularisation du tissu ovarien lors du prélèvement et le moment où le tissu est congelé, est appelé ischémie chaude. Cette phase doit être la plus courte possible afin d'éviter des lésions tissulaires sévères dues à la production de radicaux libres. Le cortex ovarien, riche en follicules primordiaux, est séparé de la médullaire puis rapidement découpé en fragments de 1 cm² puis congelés dans des cryotubes. Un examen anatomopathologique permet d'évaluer la richesse folliculaire et la recherche d'une éventuelle métastase. Les fragments de cortex sont stockés à -196°C dans l'azote liquide (Aubard et al., 1994). Des agents cryoprotecteurs hypertoniques permettent de diminuer la formation de cristaux de glace et des dépôts de sodium intracellulaires et donc les dommages dus à la congélation.

A l'heure actuelle la méthode standard de cryoconservation des tissus ovariens humains est la congélation lente avec utilisation de milieux contenant du HSA et des cryoconservateurs tels que le propanediol, le DMSO ou l'éthylène glycol avec ou sans sucrose (Hovatta, 2005).

La vitrification est une nouvelle méthode de congélation encore en cours d'évaluation pour les tissus humains mais semble être une technique d'avenir.

La décongélation s'effectue dans un bain-marie à 25°C.

Ce tissu ovarien cryoconservé peut ensuite être utilisé de différentes façons. Il peut être réimplanté sous forme de fragments de cortex au niveau d'une fossette péritonéale du pelvis (greffe orthotopique) ou au niveau d'un bras ou de l'abdomen (greffe hétérotopique) une fois que le traitement est terminé et que la patiente est en rémission ; ou réaliser la croissance et la maturation folliculaire entièrement in vitro à partir des follicules primordiaux cryopréservés soit au sein du tissu soit après isolation de ceux ci. Des études sont également en cours chez la brebis afin d'examiner la possibilité de réaliser une transplantation d'ovaire à partir d'un ovaire entier (avec ses pédicules vasculaires) congelé.

Donnez a publié en 1998 une liste spécifiques des indications potentielles de recours à la cryopréservation du tissu ovarien (Donnez and Bassil, 1998), liste qui reste d'actualité :

Pathologies malignes :

-atteintes extra pelviennes :

Cancer osseux (ostéosarcome, sarcome d'Ewing)

Cancer du sein

Mélanome

Neuroblastome

Tumeurs intestinales

-atteintes pelviennes non gynécologiques :

Sarcome pelvien

Rhabdomyosarcome

Tumeurs sacrées

Tumeurs du rectosigmoïde

-atteintes gynécologiques :

Cancer du col précoce
Cancer du vagin précoce
Cancer de la vulve précoce
Carcinome ovarien stade IA
Tumeurs « borderline » de l'ovaire

-maladies hématologiques :

Maladie de Hodgkin
Lymphome non hodgkinien
Leucémies
Médulloblastome

Pathologies bénignes :

-ovariectomie uni ou bilatérale :

Tumeur ovarienne bénigne
Endométriose sévère ou récurrente
Patientes porteuses d'une mutation BRCA-1 ou BRCA-2

-risque de ménopause précoce :

Syndrome de Turner
Histoire familiale de ménopause précoce
Maladies auto immunes nécessitant une chimiothérapie

- greffe de cellules souches hématopoïétiques :

Drépanocytose
Thalassémie majeure
Anémie aplasique
Maladies auto immunes résistantes aux traitements immunosuppresseurs

2.3.3.1 Greffe des fragments de tissu ovarien cryoconservés

2.3.3.1.1 Autogreffe

Cette greffe peut être réalisée de manière orthotopique sur l’ovaire controlatéral restant ou dans la fossette ovarienne permettant ainsi théoriquement une grossesse spontanée ; ou bien de façon hétérotopique, le plus souvent dans le tissu sous cutané de l’avant bras ou de l’abdomen permettant la reprise de la fonction endocrine ovarienne mais devant faire appel à une ponction d’ovocyte puis à une fécondation in vitro pour la fertilité.

Une trentaine d’autotransplantations orthotopiques de tissus ovariens cryoconservés ont été effectuées dans le monde et quatorze naissances vivantes ont été publiées à cette date.

Tableau 3. Récapitulatif des naissances issues d’autogreffes orthotopiques de tissus ovariens cryoconservés.

Auteur	Année	Age	Indication	H	Reproduction
Oktay	2000	29	Endométriose	+	-
Radford	2001	36	Hodgkin	+	-
Donnez	2004	37	Hodgkin	+	1 enfant
Meirow	2005	28	Lymphome malin non Hodgkinien	+	1 enfant + 1 FCS
Donnez	2006	21	Greffe de moelle osseuse pour Drépanocytose	+	
Demeestere	2006	25	Hodgkin	+	FCS 9 SA
Rosendahl	2007	6 patientes de 25 à 36 ans	Lymphomes Hodgkinien et non Hodgkinien, Cancer du sein, Sarcome d’Ewing	+	2 enfants + 1 FCS

Demeestere	2007	25	Hodgkin	+	1 enfant + 1 enfant
P P L	2006	29	Hodgkin	+	1 embryon
Silber			Hodgkin	+	1 enfant
Piver, Roux	2009	24	Greffe de moelle osseuse pour Drépanocytose	+	1 enfant + 1 enfant
Piver	2009	38	Chimiothérapie pour Périartérite Noueuse	+	1 enfant + 1 GEU
Pellicer	2009	36	Cancer du sein	+	2 enfants
Müller	2012	32	Hodgkin	+	2 enfants

L'inconvénient principal de cette technique pour les patientes initialement atteintes de néoplasie est le risque de réintroduction de la maladie après la greffe d'ovaire. Ce risque est variable selon le type de cancer, l'activité cellulaire, le stade de la maladie et la quantité de cellules transférées.

Avant toute congélation ovarienne une étude anatomopathologique est réalisée sur des fragments de cortex et sur la médullaire ovarienne afin de détecter la présence de cellules malignes ; cependant l'examen microscopique ne permet pas de détecter les métastases occultes qui sont pourtant suffisantes pour entraîner une récurrence. D'autres méthodes pour détecter ces micrométastases existent ou sont en cours de développement comme la biologie moléculaire, mais seuls les marqueurs de certains types de tumeurs existent comme le marqueur HER2 pour les cancers du sein. Des méthodes sont en cours de développement dans les domaines de l'immunohistochimie, de la cytométrie de flux ou de la génétique moléculaire comme la transcription inverse en PCR et l'hybridation in situ marquée en fluorescence.

Il faut certainement trier les indications de greffe ovariennes et ne pas proposer cette technique quand les métastases ovariennes existent cliniquement ou sont une localisation connue de la maladie comme dans le cancer du sein, les leucémies, ...

Dans ces cas là, la cryopréservation peut tout de même être proposée, mais suivie de techniques de culture in vitro par exemple.

2.3.3.1.2 Xénogreffe

Les autogreffes orthotopiques ou hétérotopiques apparaissent prometteuses, cependant l'application chez les patientes atteintes d'un cancer peut être dangereuse à cause des risques de transmission de cellules malignes qui pourraient réintroduire la néoplasie à partir du greffon. En revanche la xénogreffe écarte ce risque : elle consiste à greffer les fragments de cortex ovariens humains cryoconservés en situation hétérotopique chez la souris immunodéficiente.

La situation du greffon chez la souris peut être variée : soit dans la bourse ovarienne, soit dans la bourse rénale ou en position sous cutanée. Elle subit ensuite une stimulation hormonale permettant d'obtenir des follicules pré-ovulatoires, qui seront ponctionnés en vue de la réalisation d'une fécondation in vitro. Mais la xénogreffe, solution prometteuse, a des limites éthiques; de plus aujourd'hui il n'existe aucune preuve sur la sécurité sanitaire, notamment le risque viral et le risque de modification du génome, de la xénogreffe.

2.3.3.2 Transplantation de l'ovaire congelé entier

La réalisation d'une transplantation par micro-anastomoses vasculaires est en voie de recherche pour diminuer le temps de revascularisation après la

décongélation et ainsi maintenir la réserve folliculaire et assurer au greffon une durée de vie maximale. Cependant la cryoconservation et la décongélation d'un ovaire entier sont difficiles. La transplantation d'ovaire cryoconservé est actuellement de l'ordre de la recherche expérimentale.

2.3.3.3 Greffe de follicules primordiaux isolés à partir du tissu ovarien cryoconservé

Le follicule primordial comme l'ovocyte immature résiste bien à la cryopréservation étant donné son état quiescent. Sa petite taille favorise en outre la pénétration des cryoprotecteurs.

Oktay développe en 1997 une technique d'isolation des follicules primordiaux humains grâce à une digestion enzymatique et une microdissection (Oktay et al., 1997).

Néanmoins cette isolation reste difficile et à ce jour il n'a pas été réalisé de maturation in vitro d'un ovocyte ainsi obtenu.

Les possibilités offertes par cette technique sont multiples :

- isoler les follicules d'un ovaire cryopréservé et réaliser leur maturation in vitro, ce qui permettrait de réduire le risque potentiel de transmission de cellule néoplasique lors de la greffe (leucémies, neuroblastome, cancer de l'ovaire ou du sein)
- congeler des follicules primordiaux puis les mettre en culture, mais des recherches restent à faire dans ce domaine car on n'a pas encore identifié clairement les facteurs de croissance nécessaires et l'isolation des follicules entraîne des anomalies cellulaires qui conduisent à la dégénérescence des follicules au cours des 24 premières heures de culture.

- la transplantation d'une suspension de follicules isolée a été réalisée pour la première fois en 1993 par Carroll et Gosden chez la souris avec succès (Carroll and Gosden, 1993). Ceci permettrait de greffer un nombre connu et important de follicules en minimisant les effets secondaires dus à l'ischémie d'organe comme dans la greffe ovarienne.

2.3.3.4 Culture et maturation folliculaire in vitro des follicules primordiaux cryoconservés au sein des fragments de cortex

Une autre alternative est la culture prolongée de tissus ovariens congelés avec développement in vitro de follicules primordiaux en follicules de De Graaf, et enfin réalisation d'une fécondation in vitro.

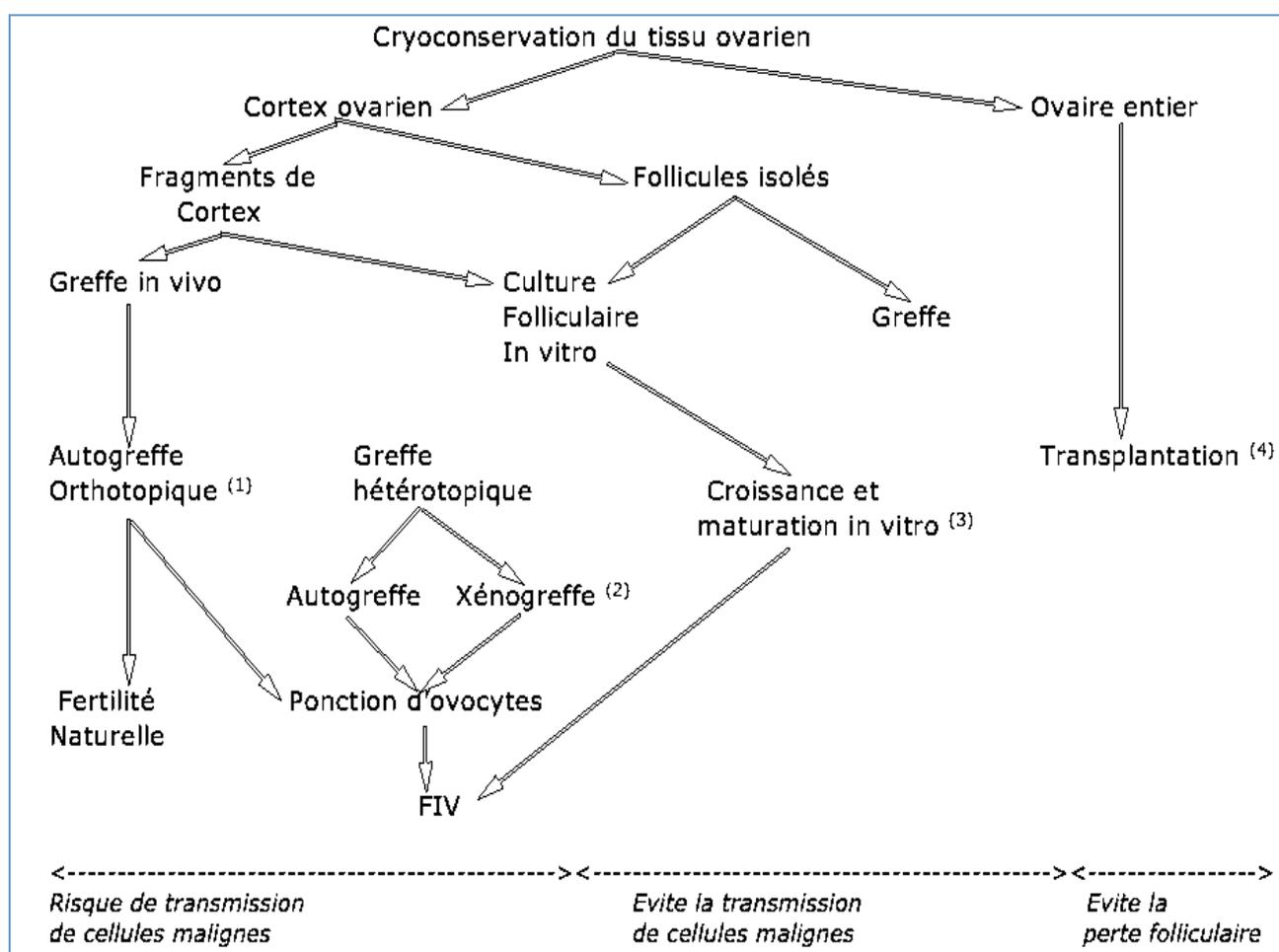
Cette technique permettrait d'éliminer le risque potentiel de transmission de cellules malignes par la greffe de tissu, elle est donc un axe de recherche important. Les indications potentielles de cette culture de cortex ovariens seraient alors les hémopathies et le cancer de l'ovaire.

Des maturations de follicules pré-antraux jusqu'aux stades antraux par stimulation par FSH ont été réalisées dans plusieurs espèces, notamment chez la souris, le hamster, le cochon et l'homme.

Mais la maturation des follicules primordiaux s'avère beaucoup plus difficile et entraîne un taux élevé de pertes folliculaires, ces mauvais résultats sont notamment dus au fait que nous ne connaissons pas les signaux induisant le passage du follicule primaire au follicule secondaire, même si des études ont montré que ces signaux étaient médiés par les cellules stromales.

Chez la souris, Eppig a obtenu en 1996 une grossesse par FIV à partir d'un follicule primordial maturé in vitro jusqu'au stade pré-ovulatoire (Eppig and O'Brien, 1996).

Nous allons détailler maintenant cette alternative de la préservation de la fertilité à partir de tissus ovariens cryoconservés.



(1) Obtention de grossesse chez la femme

(2) Obtention d'ovocyte mature chez la femme

(3) Obtention de grossesse chez la souris

(4) Obtention de grossesse chez la brebis

Figure n°2. Possibilités de préservation de la fertilité à partir de tissus ovariens cryoconservés

3. LA CULTURE FOLLICULAIRE IN VITRO : CROISSANCE ET MATURATION FOLLICULAIRE IN VITRO

La culture de follicule ovariens humains se développe depuis les années 90, avec l'ultime but d'achever la croissance et la maturation d'ovocytes, présents le plus souvent au stade primordial au sein de tissus ovariens cryoconservés avant l'initiation de traitements potentiellement stérilisateurs.

Ainsi il s'agit d'une méthode différente de la greffe, d'utilisation des fragments de cortex ovariens congelés. Elle s'est développée dans l'intention de minimiser le risque de réintroduction de la néoplasie initiale.

En effet certaines équipes comme Dolmans en 2010 ont démontrées le risque réel de réintroduction de la néoplasie initiale chez les patientes si elles bénéficiaient d'une greffe de tissus ovariens cryoconservés avant les traitements anticancéreux : découverte de cellules lymphoblastiques chez les souris immunodéficientes greffées avec des fragments cortex ovariens provenant de femmes atteintes de leucémies lymphoïdes (Dolmans et al., 2010).

Malgré l'intérêt théorique de cette technique et le fort développement des banques de tissus ovariens cryoconservés, peu d'articles originaux ont été publiés sur ce sujet ces dernières années. Les raisons avancées sont premièrement la difficulté d'accéder à des tissus ovariens humains pour les recherches, puis ensuite le faible niveau de financement de la recherche ainsi que les lacunes dans nos connaissances sur la croissance des petits follicules.

Les interactions cellulaires, la morphogénèse folliculaire, la durée de croissance du follicule primordial au follicule pré-ovulatoire et les modifications des

besoins cellulaires selon leurs stades sont donc devenues les challenges de la recherche en culture cellulaire folliculaire contemporaine.

3.1 Modèle murin : état actuel des connaissances

La croissance folliculaire *in vitro*, du follicules primordial au follicule pré ovulatoire avec un ovocyte II compétent et mature, n'a été achevée pour le moment que chez la souris.

Eppig et O'Brien en 1996 ont obtenu une souris vivante et en bonne santé grâce à une croissance et à une maturation folliculaire *in vitro* à partir d'un follicule primordial (Eppig and O'Brien, 1996).

Quelques années plus tôt Carroll ou Spears avaient déjà réussi mais à partir de follicules primaires, frais ou congelés (Carroll et al., 1990)(Spears, 1994). Ils avaient utilisés une culture en deux temps : une croissance au sein du tissu pendant 8 jours suivie d'une culture du complexe cumulo-ovocytaire après isolation enzymatique à partir du stade secondaire.

Cette méthode s'applique bien à la souris car leurs ovaires sont assez petits pour être mis en culture intacts et sont assez tendres pour être disséqués enzymatiquement.

Le modèle murin démontre que la culture *in vitro* prolongée est compatible avec la naissance d'êtres vivants en bonne santé (O'Brien et al., 2003).

Les expérimentations sur la souris, utilisant différentes méthodologies de culture, ont montrées que la culture folliculaire prolongée ne détériorait pas l'empreinte génomique du développement primaire (Anckaert et al., 2009). Ce modèle a été très intéressant pour comprendre quelques principes de base de l'interaction folliculaire, de l'initiation de la croissance folliculaire et du rôle

spécifique de certains facteurs de croissance et de différenciation (Picton et al., 2008).

Mais les différences physiologiques et anatomiques des ovaires humains et murins rendent difficile l'application des méthodes de culture couronnées de succès des follicules primordiaux ou primaires murins à l'espèce humaine.

3.2 Modèle humain : état actuel des connaissances

Chez l'homme, le développement *in vitro* complet, du follicule primordial au follicule mature et à la naissance d'un être en bonne santé, n'a pas encore été obtenu. Seul certaines étapes de la croissance ont été réussies : du stade pré-antral au stade antral (Roy and Treacy, 1993), du stade primordial au stade primaire puis secondaire (Hovatta et al., 1997).

La folliculogénèse humaine est plus difficile à reproduire *in vitro* dû fait de la grande taille des follicules et de la durée nécessaire à leur développement.

Seule la meilleure compréhension de la folliculogénèse humaine nous permettra d'aboutir dans le domaine de la culture folliculaire. Nous avons essayé de synthétiser les données connues et qui nous intéresseront pour la suite.

3.2.1 La folliculogénèse humaine

Chez la femme l'ovaire a une double fonction. Une fonction gamétogène, puisqu'il assure la croissance, la maturation puis l'émission du gamète femelle : l'ovocyte, et une fonction endocrinienne puisqu'il synthétise les hormones stéroïdes indispensables à la fonction de reproduction. C'est à partir de la puberté et jusqu'à la ménopause que l'ovaire assure cette double fonction. Durant cet intervalle de temps, seuls 300 à 400 follicules ovuleront et se

transformeront en corps jaune.

3.2.1.1 Follicules de la réserve et initiation de la croissance folliculaire

Dans l'ovaire humain, les follicules commencent à se former pendant le quatrième mois de grossesse. A la naissance, chaque ovaire contient entre 266 000 et 472 000 follicules qui constituent la réserve des follicules ovariens. Ces follicules primordiaux (cellules de la granulosa plates), intermédiaires, et petits primaires (cellules cuboïdales) ont un diamètre compris entre 25 et 65 μm .

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 atresie.

- Contrôle de l'initiation de la croissance folliculaire

Des follicules entrent en croissance (c'est l'initiation) de façon permanente depuis la vie foetale jusqu'à la ménopause. L'une des raisons pour laquelle ce processus reste mal connu tient au fait qu'il est très difficile de distinguer un petit follicule au repos d'un petit follicule en croissance.

L'apparition de cellules de la granulosa cuboïdales (follicules primaires) est considérée par certains auteurs comme le début de la croissance.

Le rôle des gonadotrophines dans l'initiation de la croissance folliculaire est controversé. Certaines observations anciennes suggéraient un rôle direct des gonadotrophines dans l'initiation. Toutefois, ce rôle positif n'a été confirmé, ni par l'expérimentation, ni par l'observation d'animaux déficients en gonadotrophines chez lesquels, bien que diminuée, l'initiation n'est pas abolie.

Plutôt qu'initier la croissance folliculaire, les gonadotrophines pourraient agir sur la maturation des follicules quiescents en transformant leurs cellules de la granulosa plates en cellules cuboïdales, rendant possible l'entrée de ces follicules en phase de croissance en réponse à un signal de nature encore inconnue. Encore faudrait-il savoir si cet effet de la FSH est direct ou relayé par d'autres molécules ?

La réserve elle-même pourrait réguler l'initiation de la croissance. Plus il y a de follicules dans la réserve, moins, en proportion, il en entre en phase de croissance. Cette rétroaction négative pourrait avoir pour origine des molécules agissant de façon paracrine. Des données récentes indiquent que les gènes codant pour certaines molécules et/ou leur récepteur, présents dans les cellules de la granulosa et/ou l'ovocyte des petits follicules, pourraient être impliqués dans l'initiation. L'initiation pourrait résulter de la levée d'une inhibition exercée par des molécules telles que l'inhibiteur de la tumeur de Wilms, une protéine (pRb) codée par le gène du rétinoblastome, l'oncoprotéine myc, ou les facteurs ubiquistes FOXO3 ou PTEN qui une fois inactivés induisent un démarrage de croissance massif et un épuisement accéléré de la réserve (Castrillon et al., 2003)(Reddy et al., 2008a).

L'initiation pourrait aussi résulter de l'action inductrice de molécules telles que l'EGF, le TGF α , l'IGF-I, la protéine de différenciation Thy-1, issue des péricytes vasculaires, et le ligand kit (appelé encore SCF pour stem cell factor) se liant à son récepteur c-kit, agissant sur l'ovocyte et/ou les cellules de la granulosa en déclenchant une cascade d'événements métaboliques aboutissant à l'entrée du follicule en phase de croissance.

En conclusion, bien que le nombre de follicules entrant en phase de croissance puisse être modulé soit par la taille du pool, soit par des facteurs endocrines ou

paracrines, nous devons admettre que les mécanismes gouvernant l'entrée en croissance des follicules au repos restent encore mal connus.

3.2.1.2 Folliculogénèse

Le processus qui conduira un follicule donné du stade primordial au stade préovulatoire ou à l'involution, s'appelle la folliculogénèse. La folliculogénèse débute dès la vie foetale et s'achève à la ménopause.

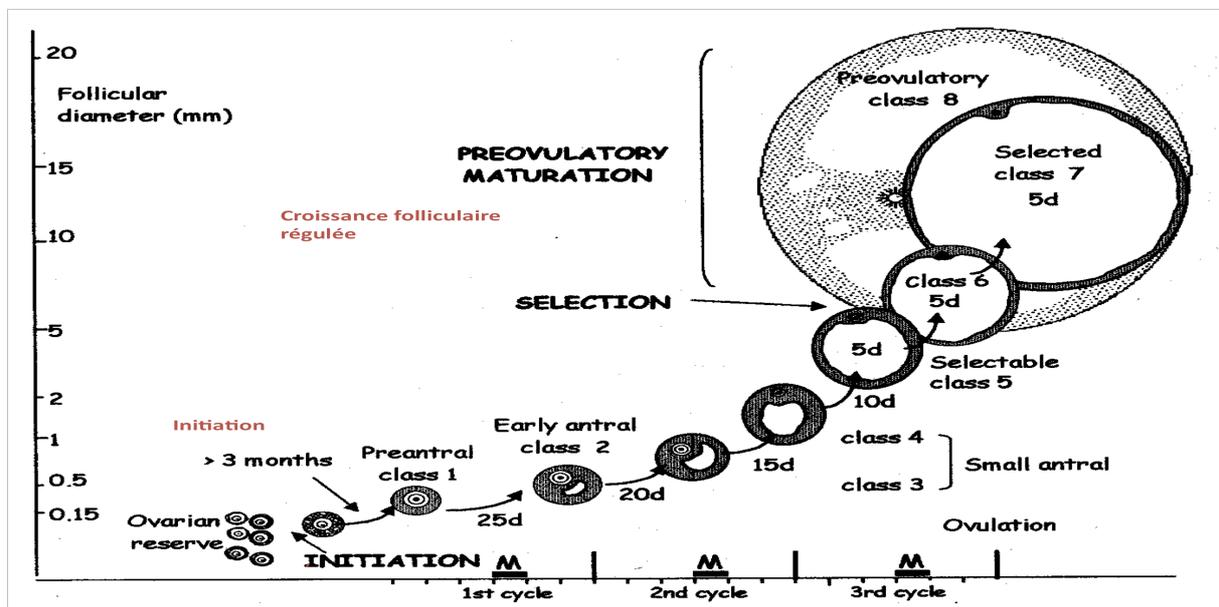


Figure 3. Représentation schématique des stades de la folliculogénèse

- Aspects morphologiques et dynamiques

Lorsque les follicules entrent en croissance, leur diamètre s'accroît, à la fois par prolifération des cellules de la granulosa et par augmentation du diamètre de l'ovocyte qui s'entoure alors d'une enveloppe, la zone pellucide, synthétisée par la granulosa et/ou par l'ovocyte. Lorsque le follicule possède plus d'une couche de cellule de la granulosa, il est appelé follicule secondaire. Lorsque ce dernier atteint un diamètre compris entre 80 et 100 μm , le stroma ovarien adjacent se stratifie et donne naissance à la thèque renfermant un réseau capillaire. Cette

vascularisation est physiologiquement importante puisque dès lors, le follicule devient directement exposé aux facteurs circulant dans le sang.

C'est lorsque le follicule atteint un diamètre compris entre 100 et 160 μm , que quelques cellules de la thèque acquièrent un aspect épithélioïde. Le follicule devient préantral ; il est alors entouré d'une thèque externe, composée de cellules fibroblastiques, et d'une thèque interne, en contact avec la lame basale et renfermant des cellules épithélioïdes et leurs cellules souches.

L'intervalle de temps nécessaire à un follicule en début de croissance pour atteindre le stade préantral n'est pas connu. Ce processus demande probablement plusieurs mois chez la femme. Gougeon en 1986 estime le temps nécessaire au développement complet du follicule, du stade primordial au stade pré-ovulatoire à 84 jours (Gougeon, 1986). Par contre il semble que cette croissance soit discontinue ; vraisemblablement les follicules grandissent *in vivo* par à coup (« start-stop ») en réponse à des influences locales. Cette hypothèse est épaulée par des études qui montrent que des follicules à des stades avancés peuvent arrêter leurs croissances sans compromettre leurs capacités à finir leur développement final (Mizunuma et al., 1999).

Le follicule préantral constitue la classe 1 d'une classification en huit classes basée sur l'aspect morphologique des follicules et le nombre total de cellules de la granulosa dans chaque follicule. Ces différentes classes représentent les stades successifs de développement que seul le follicule ovulatoire franchira et au cours desquels la granulosa présentera d'importantes transformations morphologiques et métaboliques.

À chaque moment du cycle, des follicules deviennent préantraux. Bien que l'on ignore si ce processus est continu ou pulsatile, il donne naissance à des cohortes

de follicules qui se développeront 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.

À partir du stade préantral, 70 jours seront 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.

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). Leur nombre, qui diminue fortement avec l'âge, est à ce moment du cycle compris entre 3 et 11 par ovaire chez les femmes d'âge compris entre 24 et 33 ans. Quelques rares follicules sains de diamètre compris entre 5 et 9 mm (classe 6) peuvent être aussi observés en fin de phase lutéale ; ils sont absents en milieu de phase lutéale. Au début de la phase folliculaire, le plus grand follicule sain est le follicule sélectionné. Son diamètre est compris entre 5 et 8 mm et ses cellules de la granulosa sont le siège d'une intense activité mitotique résultant dans une augmentation considérable du nombre de cellules. La taille du futur follicule ovulatoire augmente fortement pendant la phase folliculaire. Chez la femme, son diamètre passe de 7 mm en début de phase folliculaire à environ 19 mm en fin de phase folliculaire. Pendant la phase finale de la maturation folliculaire, les cellules de la granulosa sont le siège de profondes transformations morphologiques résultant de modifications du cytosquelette et des jonctions qui relient ces cellules. A partir du milieu de la phase folliculaire, la vascularisation thécale du follicule préovulatoire s'accroît de façon considérable sous l'action de facteurs angiogéniques.

- Contrôle hormonal

Classiquement, on considère que la fonction ovarienne est sous le contrôle des hormones hypophysaires. La possibilité d'induire la croissance folliculaire chez les patientes hypogonadotropes, et la stimulation de l'ovaire par des hormones exogènes montrent que les gonadotrophines stimulent la croissance folliculaire. Si des données récentes suggèrent un rôle exclusif de la FSH pour soutenir le développement folliculaire. LH et FSH sont, en revanche, indispensables pour soutenir la stéroïdogénèse ovarienne.

Les gonadotrophines agissent sur les cellules folliculaires en se liant à des récepteurs localisés à leur surface. Les récepteurs à FSH (FSH-R) sont exclusifs des cellules de la granulosa. Ils apparaissent dès le stade follicule primaire/secondaire. La synthèse des FSH-R est sous le contrôle primaire de FSH, mais d'autres facteurs agissent sur l'expression du gène contrôlant leur synthèse. Les récepteurs à LH (LH-R), sont présents sur les cellules de la thèque interne à partir du stade préantral. Leur nombre augmente avec la taille du follicule. Les LH-R apparaissent également sur les cellules de la granulosa pré-ovulatoires en milieu de phase folliculaire.

- Production des hormones stéroïdes

La stéroïdogénèse folliculaire est orientée vers la production d'estrogènes selon le modèle « two cells, two gonadotropins ». Brièvement, sous le contrôle de FSH, les cellules de la granulosa aromatisent en estrogènes les androgènes produits par la thèque interne stimulée par LH.

Chez la femme, la thèque interne synthétise principalement de l'androstènedione et, dans une moindre mesure, de la testostérone. La production d'androgènes par cette thèque résulte de l'activité d'enzymes telles

que l'enzyme coupant la chaîne latérale du cholestérol, la CYP11A, la 17α -hydroxylase/lyase (CYP17), et la 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase (HSD3B2).

La stéroïdogénèse des cellules de la granulosa est principalement orientée vers la production d'estradiol avant la décharge ovulante, puis vers une production de progestérone après. La 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17β HSD), présente dans la granulosa dès le stade follicule primaire transforme l'androstènedione en testostérone, et l'aromatase transforme la testostérone en estradiol. A la fin de la maturation préovulatoire, après acquisition par les cellules de la granulosa de la réceptivité à LH, l'aromatase peut être stimulée par LH.

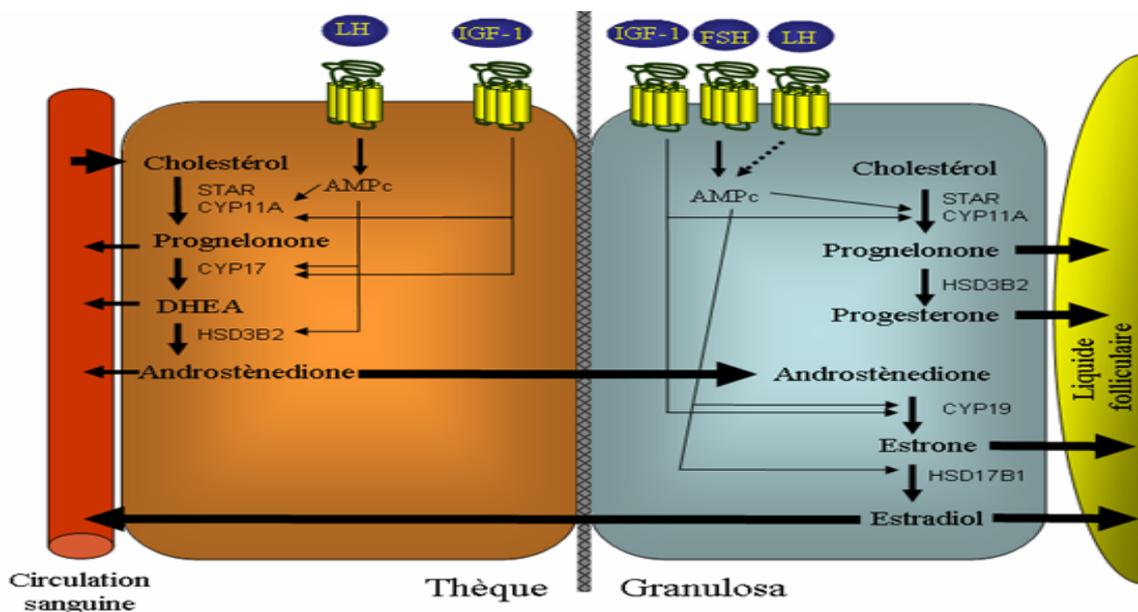


Figure 4. Synthèse de la stéroïdogénèse de la thèque interne et de la granulosa (Sasseville, 2007)

- Régulation de la croissance folliculaire

Les cellules du follicule préovulatoire, et spécialement les cellules de la granulosa, deviennent aptes à assurer leur fonction endocrine à la fin d'un

processus hautement régulé qui les conduit d'un statut prolifératif à un statut différencié par acquisition progressive de la réceptivité des cellules de la granulosa et des cellules de la thèque interne à la FSH et la LH, respectivement. Cette réceptivité est sous le contrôle partiel, sinon total, de substances synthétisées par l'ovaire et agissant de façon paracrine et/ou autocrine.

Croissance folliculaire basale :

Pendant la croissance basale, depuis le stade préantral (classe 1, environ 0,15 mm) jusqu'à la classe 4 (1 à 2 mm), les follicules sont caractérisés par une vitesse de croissance faible (fonction de l'index mitotique des cellules de la granulosa) qui s'accroît, toutefois, avec la taille des follicules. Pendant le cycle, il n'y a aucun changement significatif de l'activité mitotique des cellules de la granulosa et de la qualité des follicules, suggérant que ces derniers sont insensibles aux variations cycliques des niveaux circulants de gonadotrophines. Comme la stéroïdogénèse est pratiquement inexistante, on peut considérer que pendant la croissance basale, les follicules humains sont très peu sensibles à FSH et LH.

En dépit de leur faible sensibilité à la FSH, les petits follicules se développent. La production d'EGF et de $TGF\alpha$, qui stimulent la prolifération de la granulosa *in vitro*, augmente avec la taille des follicules. L'action de ces facteurs de croissance pourrait être renforcée par l'IGF-I d'origine hépatique, puisque le nombre d'IGF-I-R augmente dans le follicule à partir du stade antral débutant. L'absence d'activité stéroïdogène des follicules pendant la croissance basale pourrait être liée à la production d'EGF et de $TGF\alpha$ qui inhibent *in vitro* la stéroïdogénèse induite par LH et FSH au niveau de la thèque interne et des cellules de la granulosa, respectivement.

Follicules sélectionnables (classe 5 : 2 - 5 mm) :

Les follicules sélectionnables sont sensibles aux variations gonadotropes cycliques. Pendant la fin de phase lutéale, lorsque après la lutéolyse les taux circulants de FSH s'élèvent, leur taux d'atrésie diminue de façon significative et l'index mitotique de leur granulosa s'accroît fortement. De plus, ces follicules répondent à l'hMG. Ainsi, bien que leur aromatasase soit faiblement active (très faible production d'estradiol), les follicules sélectionnables deviennent plus sensibles à FSH.

En dépit d'un nombre inchangé de FSH-R sur les cellules de la granulosa, leur sensibilité à FSH peut s'être accrue, puisqu'une modification des mécanismes de transduction pourrait intervenir lorsque les follicules atteignent une taille critique. D'un autre côté, des peptides synthétisés par les follicules eux-mêmes peuvent être impliqués dans cette évolution.

L'activine (dimère de la chaîne β de l'inhibine), l'EGF et le TGF α , dont les concentrations sont maximales dans les follicules de diamètre compris entre 2 et 5 mm, stimulent la prolifération de la granulosa. Avec l'IGF-I d'origine extra-ovarienne, ces peptides ont donc la capacité d'accroître la prolifération des cellules de la granulosa induite par FSH quand les niveaux de FSH augmentent, spécialement en fin de phase lutéale.

La thèque interne des follicules sélectionnables possède des IGF-IR et davantage de LH-R que pendant la croissance folliculaire basale. Comme l'IGF-I, seul ou en synergie avec LH, stimule la production d'androstènedione par la thèque interne, les follicules sélectionnables peuvent produire des androgènes aromatisables en dépit de l'action inhibitrice de l'EGF et de l'activine sur la production d'androgènes thécaux induite par LH. Toutefois, l'action inhibitrice de ces derniers peptides limite la production d'androgènes.

L'EGF et le TGF α inhibent l'aromatase induite par FSH, et sont sans doute impliqués dans la faible potentialité de ces follicules à produire de l'estradiol.

Sélection du follicule ovulatoire :

Le follicule sélectionné pourrait être celui qui possède les cellules de la granulosa se développant le plus rapidement et qui se différencie le plus tôt en réponse à l'augmentation de FSH de l'intercycle, c'est-à-dire le follicule possédant le seuil de réponse à FSH le plus bas. La diminution de ce seuil pourrait être induite par l'activation ou la répression de gènes spécifiques.

Maturation préovulatoire :

Au cours de la maturation préovulatoire, le follicule produit des quantités croissantes de molécules : inhibine, follistatine, IGF-II, agissant de façon positive sur la production d'androgènes et d'estrogènes par la thèque interne et les cellules de la granulosa, respectivement.

Les cellules de la granulosa du follicule préovulatoire acquièrent également des LH-R. La FSH est principalement responsable de cette acquisition.

Après la décharge ovulante, LH est la principale hormone impliquée dans la modification de la stéroïdogénèse du follicule préovulatoire survenant après la décharge ovulante. Après cette dernière, les cellules de la granulosa ne prolifèrent plus. En plus du fait que la granulosa est maintenant hautement différenciée, plusieurs molécules peuvent être impliquées dans le blocage des divisions cellulaires. Parmi elles, il a été observé que la progestérone, agissant via ses récepteurs présents dans les cellules de la granulosa préovulatoires, inhibe directement la prolifération de ces cellules.

3.2.1.3 Atrésie folliculaire

- Aspects morphologiques

On sait depuis longtemps que la plupart des follicules présents à la naissance involuent, et que moins de 1 % d'entre eux ovulent. Ainsi, le destin « normal » de la plupart des follicules est de disparaître par atrésie. 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.

Dans les tout petits follicules, c'est l'ovocyte qui montre les premiers signes d'altération ; son cytoplasme se colore fortement, son noyau se contracte et sa chromatine se condense. Dans les follicules en croissance de diamètre inférieur à 1 mm, l'ovocyte subit une évolution identique et disparaît rapidement, quelques cellules de la granulosa pycnotiques sont présentes et la thèque interne s'hypertrophie.

- Aspects quantitatifs

L'atrésie des follicules ovariens est la résultante d'une atrésie tonique, qui affecte principalement les plus petits follicules, et d'une atrésie cyclique liée au cycle menstruel.

L'atrésie tonique affecte d'abord les follicules de la réserve. Très forte pendant la vie embryonnaire elle diminue jusqu'à environ 35 ans et est la principale cause de l'épuisement de la réserve. Les follicules secondaires sont peu affectés par l'atrésie. Pendant la croissance basale, l'atrésie n'est pas influencée par le stade du cycle. Les follicules préantraux et à antrum débutant présentent un taux d'atrésie élevé (environ 30 %) tandis que les follicules d'une taille comprise entre 0,5 et 2 mm sont moins touchés (environ 15 %). En revanche,

l'atrésie des follicules sélectionnables est cyclique et inversement corrélée aux taux de FSH circulants.

- Causes de l'atrésie folliculaire

La production de radicaux libres, qui est une conséquence du métabolisme respiratoire normal, pourrait jouer un rôle clé dans l'induction de l'apoptose au niveau des cellules de la granulosa. En modifiant l'équilibre ionique (ions Ca^{2+} et Mg^{2+}) de la cellule, les radicaux libres conduiraient à l'activation d'une endonucléase déclenchant la cascade apoptotique et la mort de la cellule. Mais une question demeure : qu'est-ce qui induit l'atrésie ?

Il est bien connu que la FSH, mais aussi l'EGF, le $\text{TGF}\alpha$ et le FGF2 ont la propriété de prévenir l'atrésie folliculaire. Ainsi, la FSH, pourrait préserver les follicules de l'atrésie en inhibant la production de radicaux libres. Les cellules de la granulosa posséderaient des gènes dont l'expression conduirait à la production de molécules antioxydantes ou destructrices de radicaux libres et réprimant donc la mort cellulaire. La FSH stimule la production d'AMPc, d'EGF, de FGF2, et de divers ligands de récepteurs tyrosine kinase. Ces molécules ont la propriété de favoriser l'entrée dans la granulosa d'acide ascorbique impliqué dans la destruction des radicaux libres.

Paradoxalement, la FSH qui protège le follicule de l'atrésie, induit l'expression d'une endonucléase dont l'activation conduira à l'involution du follicule.

En conclusion, on peut dire qu'aujourd'hui les mécanismes conduisant à l'apoptose des cellules de la granulosa sont mieux connus, même si de nombreux points restent à éclaircir. Au fur et à mesure qu'il grandit, le follicule produit de plus en plus de déchets métaboliques, les radicaux libres, dont l'accumulation est néfaste au développement ultérieur du follicule. Si la FSH

est présente en quantités suffisantes, elle permettra aux cellules de la granulosa d'éliminer les radicaux libres ; si elle est en quantités insuffisantes, le follicule s'involuera. Le rôle de la FSH apparaît donc fondamental dans la folliculogénèse puisque non seulement elle soutient la croissance des follicules et prévient leur atrophie, mais contrôle le quota ovulatoire spécifique en dotant les follicules de l'équipement enzymatique permettant d'éliminer les follicules en surnombre.

3.2.1.4 Développement et maturation de l'ovocyte

Peu après l'entrée en prophase de première division de la méiose, le noyau de l'ovocyte (appelé vésicule germinative) reste bloqué au stade diplotène, l'ovocyte est alors appelé ovocyte I. Après l'initiation de la croissance, le diamètre de l'ovocyte augmente rapidement puis, tandis que s'accélère le développement du follicule, la taille de l'ovocyte se stabilise. Son extraction du follicule n'entraînera la reprise de la méiose, dont la rupture de la vésicule germinative est la première manifestation visible, que lorsque le follicule aura atteint, chez la femme, un diamètre au moins égal à 12 mm. On dit alors que l'ovocyte est devenu « compétent ».

Le blocage de la méiose est contrôlé par l'environnement somatique de l'ovocyte, les cellules folliculaires transmettant à l'ovocyte un facteur inhibant la méiose par passage transcellulaire via des jonctions « gap ». Dans le follicule sain, l'ovocyte reste bloqué au stade diplotène jusqu'à ce que la décharge ovulante induise la reprise de la méiose et sa poursuite jusqu'au stade de métaphase de 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.

Après la décharge ovulante, la rupture des jonctions « gap » serait nécessaire non seulement à la reprise de méiose mais aussi à la mucification et à l'expansion du cumulus, elle-même impliquée dans la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte et dans la capacitation du spermatozoïde.

FSH et LH contrôlent le développement ovocytaire, mais aucune étude ne démontre à ce jour la présence de leurs récepteurs sur l'ovocyte. Les effets de ces hormones sur le développement ovocytaire sont donc indirects et se font via des médiateurs paracrines, tels que les IGFs, l'EGF, les peptides de la famille de l'inhibine et les stéroïdes provenant des cellules de la granulosa, de la thèque interne ou d'autres cellules ovariennes.

3.2.2 Modèles de culture actuels

De nombreux milieux de culture de base ont été comparés depuis les années 90. Il semble que depuis quelques temps le milieu le plus utilisé soit l'alpha Minimal Essential Medium (α MEM).

Ce milieu est actuellement le milieu de référence pour la culture ovarienne humaine dans des systèmes sans sérum, comparé au Waymouth ou au Earle (Wright et al., 1999).

A ce milieu est habituellement ajouté des facteurs de croissance et des hormones pour la croissance folliculaire. De nombreux essais ont été réalisés comme le montre le tableau 4 et il semble que certains facteurs sortent du lot ; tels que la FSH, l'insuline, l'activine A et le facteur de croissance et de différenciation le GDF9, pour promouvoir le développement et la survie folliculaire.

Des facteurs anti-apoptose ont également été testés : acide ascorbique, GMP cyclique et AMP cyclique (Scott et al., 2004).

Tableau 4. Hormones et facteurs de croissance utilisés dans les cultures de cortex ovariens humains frais et congelés (Smitz et al., 2010)

Auteurs	Hormones, facteurs de croissance	Etat	Stades	Observations
Roy et Treacy 1993	FSH	Frais	Préantral à petit antral	augmente la croissance et la production de stéroïdes et la formation de l'antrum
Howatta et al 1997	FSH, LH, insuline, sérum humain	Frais et congelés	Primordial à petit antral (15- 21 jours)	augmente la survie et la croissance
Roy and Cole 1998	FSH, EGF, TGFB	Frais	Préantral (2jours)	augmente la croissance grâce à FSH et EGF
Wright et al 1999	FSH, ITS, HSA	Frais	Primordial à pré antral dans le cortex (10 jours)	augmente la croissance
Louhio et al 2000	Insuline, IGF1, IGF2, HSA	Frais	Primordial à pré antral dans le cortex (21 jours)	augmente la survie et la croissance
Hreinsson et al 2002	GDF 9, ITS, HSA	Frais	Primordial à pré antral dans le cortex (14 semaines)	augmente le développement en follicule secondaire et la survie
Schmidt et al 2005	AMH, FSH, LH, testostérone, ITS, HSA	Congelés	Primordial à pré antral dans le cortex (25 jours)	augmente l'initiation de la croissance et la survie
Carlsson et al 2006a	Kit ligand, FSH, ITS, HSA, Ag anti c-Kit	Frais	Primordial à petit antral (25 jours)	l'ovocyte meure après avoir bloqué son récepteur kit
Carlsson et al 2006b	AMH, ITS, HSA	Frais	Primordial dans cortex	inhibe l'initiation de croissance
Telfer et al 2008	Activine A, HSA	Vitrifiés	Primordial dans cortex (6jours) puis isolés	croissance significative et maturation du primordial à l'antral

HSA : Human Serum Albumin, ITS : Insulin Transferrin Selenium,

Le schéma de culture actuel est la culture au sein du tissu pendant les stades de développement précoces afin d'initier la croissance puis d'isoler les follicules et

de poursuivre la croissance au sein de matrices extracellulaires jusqu'au stade antral (Telfer and McLaughlin, 2007)(Telfer et al., 2008).

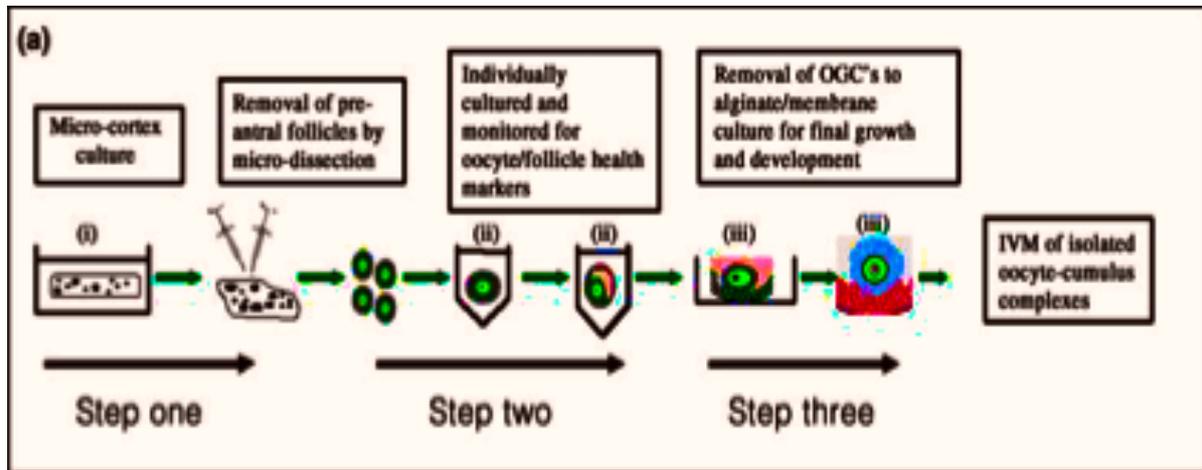


Figure 5. Modèle de culture *in vitro* des follicules humains en plusieurs étapes (Telfer and Mc Laughlin, 2007). (i) : follicules primordiaux, (ii) : follicules pré-antraux et antraux, (iii) : complexes cumulo-ovocytaires (OGCs) isolés placés sur des membranes d'alginate.

4. OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL : ESSAI DE MISE AU POINT D'UN MODELE DE CULTURE FOLLICULAIRE IN VITRO.

L'ensemble des différents modèles de cultures que nous avons mis au point s'appuie sur les données de la littérature.

Les trois cultures de notre travail présentent la même taille et la même forme de fragments : fines lamelles de 2mm^2 selon l'étude de Telfer en 2008 (Telfer et al., 2008).

Les conditions atmosphériques de l'étuve durant la culture: 37°C sous 5% de CO_2 sont également identiques.

4.1 Choix de l'origine des cortex

Aujourd'hui les lois de santé publique et de bioéthique en France n'apportent pas de réponses claires à propos du choix de l'origine des cortex ovariens possiblement utilisables pour la culture in vitro.

Comme nous l'avons vu cette incertitude éthique entraîne des difficultés pour effectuer ce genre de recherche et ralentit les avancées en matière de folliculogénèse in vitro ainsi qu'in vivo.

Nous voyons dans le tableau les origines les plus fréquentes des cortex ovariens retrouvées dans la littérature.

Tableau 5. Sources des cortex ovariens humaines utilisés en recherche (Smitz et al., 2010).

Source	Etat	Avantages	Inconvénients
Ovariectomie <i>Abir et al. 1997</i>	Frais et congelés	Larges échantillons	Age souvent avancé de la donneuse
Fragments issus des tissus ovariens cryoconservés <i>Xu et al. 2009</i>	Frais ou congelés	Bonne densité folliculaire	Réduit le tissu disponible pour son utilisation clinique
Transsexuels <i>Van Den Broeck et al. 2001</i>	Frais ou congelés	Bonne densité folliculaire	Traitement antérieur par androgènes
Biopsies lors de la ligature tubaire ou autres cœlioscopies <i>Scott et al. 2004</i>	Frais ou congelés	Facile à obtenir	Variabilité de la densité folliculaire (patiente infertile)
Tissus ovariens issus de donneuses décédées <i>Schmidt et al. 2005</i>	Congelés	Bonne densité folliculaire	Rares échantillons
Biopsies lors de césarienne <i>Carlsson et al. 2006, 2009</i>	Frais ou congelés	Intervention fréquente, patientes fertiles, bonne densité folliculaire	Petits échantillons dû fait du risque de saignements

Dans la plupart des études, les fragments de cortex ovariens mis en culture sont frais. Nous verrons que cela entraîne des questionnements quant à la superposition des résultats de la littérature, aux indications qui nous intéressent à savoir des patientes ayant dûes cryoconserver une partie de leur réserve ovarienne avant un traitement potentiellement stérilisateur.

4.2 Choix de la culture au sein du cortex : architecture 3D versus 2D

De nombreuses recherches se penchent aujourd'hui sur l'importance du maintien de l'architecture 3D du follicule et donc de l'interaction ovocyte-granulosa-stroma dans le développement des petits follicules en culture.

Comme nous l'avons vu la croissance des cellules de la granulosa et certains processus métaboliques sont contrôlés par des sécrétions ovocytaires. D'autre part l'ovocyte est incapable de transporter certains acides aminés, de mener à bien la glycolyse ou la synthèse de cholestérol sans la coopération des cellules de la granulosa qui fournissent les facteurs nécessaires (Eppig, 1991).

L'ovocyte contourne ces déficiences métaboliques en stimulant l'expression de gènes spécifiques se trouvant dans les cellules de la granulosa, qui contrôlent la synthèse d'acides aminés et d'enzymes dont ils ont besoin.

Plusieurs de ces gap junctions et de ces communications intercellulaires durant la culture in vitro déclenchent une ovulation prématurée et éventuellement une dégénérescence de ces ovocytes libérés (Eppig et al., 2005).

West en 2007 s'est aperçu que dans le conventionnel système de culture en 2-dimensions, le follicule tend à s'aplatir, les cellules de la granulosa qui entourent et nourrissent l'ovocyte migrent, le laissant nu et incapable de finir sa croissance

(West et al., 2007). Ceci est spécialement vrai pour les follicules primordiaux humains qui nécessitent au moins trois mois de culture (Gougeon, 1986).

Le maintien de l'architecture en 3 dimensions et de l'interaction granulosa-ovocyte paraît être un critère indispensable pour le succès de la croissance folliculaire in vitro.

C'est pourquoi ces trois cultures ont pour point commun la culture prolongée au sein du cortex ovarien sans isolement précoce des complexes cumulo-ovocytaires. Ainsi nous avons voulu montrer que le stroma adjacent aux complexes avait un rôle important tant dans le maintien de l'architecture en 3 dimensions que dans les échanges des facteurs nécessaires à la croissance folliculaire : hormones, facteurs de croissance.

4.3 Choix de tissus ovariens congelés ou frais

Hovatta montre en 1997 que la culture de tissus ovariens décongelés n'affecte pas la densité ou la proportion de follicules viables et que ceux-ci restent capables de supporter un développement normal par la suite (Hovatta et al., 1997).

Les follicules primordiaux représentent alors la population la plus abondante de follicule dans ces fragments de cortex congelés car ce sont les follicules les plus résistants aux dommages de la cryoconservation.

Cette étude a confirmé l'intérêt de la cryoconservation de tissus ovariens humains dans le cadre de traitements stérilisants.

Par contre la possibilité de cryoconservation de cortex ovariens de femme âgées de plus de 38 ans ainsi que de cortex ayant déjà reçu 1 à 2 semaines de chimiothérapie reste incertaine. Il apparaît dans ces cas-là que la densité

folliculaire et la survie ne soient pas aussi bonnes que celles retrouvées par Howatta en 1997 (Hovatta et al., 1997) ; comme nous avons pu aussi nous en apercevoir dans notre étude. Cependant il s'agit là d'indications de cryoconservation de tissus ovariens possibles de rencontrer fréquemment.

4.4 Choix des milieux de culture

L'apport de FSH a été fait dans l'ensemble des milieux de chaque culture, car comme nous l'avons vu, ses propriétés anti-apoptotiques et d'inducteur de croissance des petits follicules sont reconnues.

4.4.1 Milieu avec ou sans sérum humain

L'apport de sérum humain dans les systèmes de cultures était considéré comme systématique pour la survie et la croissance des follicules, vraisemblablement dû fait de l'apport en hormones, nutriments et facteurs de croissance.

Mais le sérum pourrait également exercer un effet inhibiteur sur la croissance des cellules de la granulosa.

Oktay en 1998 rapporte que les cellules de la granulosa humaines cultivées en présence de sérum humain prolifèrent rapidement en cellules épithélioïdes monocouches, ce qui dans le cas des cultures folliculaires peut entraîner la perte des rapports entre l'ovocyte et la granulosa et l'extrusion de l'ovocyte (Oktay et al., 1998).

Nous avons voulu montrer l'effet de l'adjonction de sérum humain d'origine fœtal aux cultures, donc riche en facteurs de croissance, sur l'initiation de la croissance et à la survie.

4.4.2 Apport de bpV (pic)

De nombreux follicules sont présents sur les ovaires humains, mais la plupart d'entre eux sont dormants pour des années voir des décennies.

Durant la vie reproductive, des mécanismes intra ovariens inconnus activent la mise en croissance d'un petit nombre de follicules (≈ 1000) primordiaux quiescents par mois. Ces follicules activés se transformeront en follicules primaires puis secondaires avant d'acquérir une cavité antrale ; qui atteindront le stade pré ovulatoire pour certains d'entre eux grâce à la stimulation par les gonadotrophines. Les autres restent quiescents pour parfois de très longues années dû fait probablement de signaux locaux inhibiteurs.

Certaines équipes se sont donc penchées sur les gènes et processus permettant l'activation de ces follicules dormants. Il apparaît dans les études utilisant des souris mutées que la délétion, au niveau des ovocytes, des gènes de la voie PTEN-PI3K-Akt-Foxo3 active prématurément la croissance de tous les follicules primordiaux dormants (Reddy et al., 2008b).

Li et al en 2010 mettent en évidence une augmentation de 4 fois du nombre de follicules secondaires et antraux retrouvés après culture de cortex frais pendant 24 heures avec un inhibiteur de PTEN : le bp V(pic) (Li et al., 2010).

Cet inhibiteur de PTEN activerait donc les follicules primordiaux quiescents au sein des fragments de cortex ovarien et favoriserait leur croissance.

Ces recherches n'ont parallèlement pas retrouvés d'augmentation de malignité dans les fragments d'ovaire cultivés étant donné que le PTEN est un gène suppresseur de tumeur ; de plus l'étude de Fan en 2008 met en évidence une accélération de la croissance folliculaire sans effet sur la fertilité (Fan et al., 2008).

Par conséquent il apparaît que le développement ovocytaire peut être achevé au sein d'une croissance folliculaire rapide. En effet, cette croissance accélérée a été mise en œuvre dans d'autres cultures folliculaires non humaines et a donné lieu à l'obtention d'ovocytes ayant atteints leur pleine croissance.

Le challenge à l'heure actuelle est de définir les conditions de culture *in vitro* afin d'assurer un taux de croissance supportable pour le développement normal d'un ovocyte.

Notre principal objectif a été de montrer l'effet activateur du bpV (pic) sur l'initiation de la croissance par mobilisation du pool de follicules dormants dans nos cultures.

4.4.3 Apport d'activine A

L'activine fait partie de la famille des TGF β et existe sous forme homo ou hétérodimérique comprenant 2 sous unités (A ou B).

L'activine A est l'isoforme la plus fréquente. Elle est exprimée par les cellules de la granulosa et les ovocytes et est reconnue pour être impliquée dans le développement des follicules pré-antraux (Findlay et al., 2002).

Sur le plan systémique l'activine stimule la sécrétion de FSH par l'hypophyse (Katayama et al., 1990), alors que dans l'ovaire l'activine stimule la croissance folliculaire en augmentant la prolifération des cellules de la granulosa et en favorisant la formation de l'antrum (Mizunuma et al., 1999).

L'activation de la croissance des follicules *in vitro* par l'activine a été démontré chez les ovins (Thomas et al., 2003), les caprins (Silva et al., 2006), et chez les rongeurs (McGee et al., 2001).

Dans l'étude de Telfer en 2008, l'activine A a confirmé chez l'homme son action *in vitro* sur le développement et la croissance des follicules pré-antraux isolés (Telfer et al., 2008).

Dans nos cultures nous avons choisis de tester les propriétés de l'active A dès l'initiation de la croissance folliculaire.

4.4.4 Choix du milieu de culture basal

Nous avons vu que l' α MEM était le milieu actuellement de référence pour la culture ovarienne humaine dans des systèmes sans sérum, comparé au Waymouth ou au Earle (Wright et al., 1999).

Nous avons voulu tester les effets d'un autre milieu de culture cellulaire enrichi, l'Amniomax-II habituellement utilisé en cytogénétique pour la culture cellulaire fibroblastique.

Notre hypothèse de départ a été que ce milieu serait favorable à la survie des cellules fibroblastiques du tissu conjonctif de soutien des follicules, permettant ainsi une meilleure interaction stroma-ovocyte-granulosa.

MATERIEL ET METHODES

1. PATIENTE

Les fragments de cortex ovarien ont été prélevés chez une femme de 28 ans, atteinte d'un Lupus Erythémateux Disséminé depuis 1984 et traitée par immunosuppresseurs à partir de mai 1998.

Au moment du prélèvement ovarien en 1998, en vue de la conservation de sa fertilité, la patiente avait déjà reçue 2 grammes de cyclophosphamide.

Les fragments ovariens ont été congelés selon un protocole de congélation lente au DMSO et conservés dans l'azote liquide de 1998 à 2011. Cette patiente a par la suite obtenu une grossesse spontanée lors d'une rémission de sa maladie en 2001.

En 2010 elle renonce à un autre projet parental et lègue à la science les fragments de cortex ovarien congelés. En 2011 elle subit une hystérectomie totale pour une néoplasie cervicale intra épithéliale de grade 3 récidivant.

Dans ces circonstances nous avons soumis la possibilité d'utiliser ces fragments de cortex ovarien au Comité d'éthique du CHU de Limoges. Cette requête nous a été accordée en septembre 2010.

2. CULTURES TISSULAIRES

Les cortex de chacunes des cultures ont été décongelés par réhydratation successive dans des bains de L-15 Leibovitz Glutamax-I (Gibco Invitrogen®) pour la culture n°1 et des bains d'Alpha Minimal Essential Medium (α MEM ; Gibco Invitrogen®) pour les cultures n°2 et n°3, préchauffés à 37°.

Les cortex ont ensuite été débarrassés des éventuels débris restants de la médullaire grâce à des instruments de microchirurgie, puis découpés en petits fragments de 2 mm³ (selon la technique de Scott et al 2004b) à l'aide de trocards à biopsie stériles.

Nous avons obtenus un total de 30 fragments pour les cultures n°1 et 3, et 39 fragments pour la culture n°2.

Trois de ces fragments ont été placés immédiatement (avant la mise en culture) dans du paraformaldéhyde afin d'être fixées pour l'évaluation histologique initiale de la richesse folliculaire. Ces fragments n'ont donc pas pu être replacés dans les cultures en suivant.

Puis 9 fragments de 2mm ont ensuite été répartis dans chacune des séries des trois cultures à J0.

Au total 27 fragments ont donc été mis en culture pour les cultures n° 1 et 3 ; et 36 pour la culture n°2.

A différents temps de la culture : J4, J7, J14; trois fragments choisis de façon aléatoire de chacune des séries de chacune des cultures ont été exclus de la culture pour être fixés dans du paraformaldéhyde pour une analyse histologique de la différenciation folliculaire et de la survie.

Ainsi à J4, à J7 et à J14, les cultures n°1 et 3 perdaient 9 fragments et la culture n° 2 en perdait 12 ; de sorte qu'à J14 il n'y avait plus de fragments en culture.

2.1 Culture n° 1

Toutes les séries utilisent le même milieu de culture de base : L-15 Leibovitz Glutamax-I (Gibco, Invitrogen).

A ce milieu est ajouté, dans les 3 bras de façon identique, des antibiotiques : Penicillin (50 UI/ml) Streptomycin (50 µg/ml) solution (Invitrogen®), de la

FSH (GonalF , Serono) à 150 mUI/ml, et un activateur de croissance : le bpV (pic) (Biovision®) pendant les 24 premières heures à 100 μ Mol/L.

Puis trois concentrations différentes de sérum humain foetal ont été administrées dans chacun des 3 bras :

- Série A : 10% de sérum foetal
- Série B : 30% de sérum foetal
- Série C : 50% de sérum foetal

Dans chacun des trois bras de culture les fragments sont placés un par un dans des puits de boîtes de culture cellulaires 24 puits (NUNC, Nunclon®) pendant 14 jours successifs, dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂. Chaque puits contient 1 ml de chacun des milieux des séries A, B, C. Les milieux de culture de chacun des puits sont remplacés intégralement toutes les 48 heures.

2.2 Culture n° 2

Toutes les séries utilisent le même milieu de culture de base : l' α MEM (Gibco, Invitrogen®).

A ce milieu est ajouté de façon identique dans les 3 bras, des antibiotiques : Penicillin (50 UI/ml) Streptomycin (50 μ g/ml) solution (Invitrogen), de la FSH (GonalF , Serono) à 150 mUI/ml, de l'insuline à 10 ng/ml et de l'Activine A à 100 ng/ml.

- Série A : ajout de bpV (pic) à 100 μ mole/L pendant les 24 premières heures de la culture
- Série B : milieu témoin
- Série C : ajout de cholestérol CD Lipid Concentrate (Invitrogen®) à 1/100

- Série D : ajout de bpV (pic) à 100 $\mu\text{mole/L}$ pendant les 24 premières heures de la culture et de cholestérol CD Lipid Concentrate (Invitrogen®) à 1/100.

Dans chacun des trois bras de culture les fragments sont placés un par un dans des puits de boîtes de culture cellulaires 24 puits (NUNC, Nunclon®) pendant 14 jours successifs, dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂. Chaque puits contient 1 ml de chacun des milieux des séries 1, 2, 3, 4. Les milieux de culture de chacun des puits sont remplacés intégralement toutes les 48 heures.

2.3 Culture n° 3

Toutes les séries utilisent le même milieu de culture de base : l'AmnioMAX-II Complete (Gibco, Invitrogen®). Ce milieu est habituellement utilisé pour la culture in vitro des cellules amniotiques qui sont essentiellement des cellules épithéliales foetales desquamées. Ce milieu contient déjà des antibiotiques : gentamicine, de la L-Glutamine et des facteurs de croissance.

- Série A : Pour la constitution d'une culture témoin, les 13 fragments de cortex de 2 mm³ de cette série ont été placés dans un milieu de culture constitué d'AmnioMAX et de 150 mUI/ml de FSH humaine recombinante (Gonal F, Serono).

- Série B : Cette série se compose d'AmnioMAX et de 150 mUI/ml de FSH comme précédemment mais pendant les 24 premières heures est ajouté au milieu 100 $\mu\text{mole/L}$ de bpV (pic).

- Série C : Cette série est composée d'AmnioMAX, de FSH à 150 mUI/ml, de bpV (pic) à 100 $\mu\text{mole/L}$ pendant les 24 premières heures et de 10% de sérum de sang foetal.

Dans chacun des trois bras de culture les fragments sont placés un par un dans des puits de boîtes de culture cellulaires 24 puits (NUNC, Nunclon) pendant 14 jours successifs, dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂. Chaque puits contient 1 ml de chacun des milieux des séries 1, 2, 3. Les milieux de culture de chacun des puits sont remplacés intégralement toutes les 48 heures.

Tableau 6. Récapitulatif des milieux des 3 cultures

	Série A	Série B	Série C	Série D
Culture n°1	Leibovitz FSH bpV Sérum humain 10%	Leibovitz FSH bpV Sérum humain 30%	Leibovitz FSH bpV Sérum humain 50%	
Culture n°2	Alpha MEM FSH Insuline Activine A bpV	Alpha MEM FSH Insuline Activine A	Alpha MEM FSH Insuline Activine A Cholestérol	Alpha MEM FSH Insuline Activine A bpV Cholestérol
Culture n°3	Amniomax FSH	Amniomax FSH bpV	Amniomax FSH bpV Sérum humain 10%	

2.4 Obtention de sérum de sang fœtal humain

On réalise des prélèvements de sang fœtal humain par ponction de sang au niveau des cordons de fœtus de sexe féminin lors de la délivrance. Ce sang est alors centrifugé à 2000 tours/min pendant 10 minutes ; le sérum ainsi obtenu est recueilli puis filtré avant d'être stocké dans des congélateurs à -20°C.

2.5 Outils de mesure

Les biopsies initiales et les fragments stoppés dans leur culture à J3, J7, J14, ont été fixés dans 4% de paraformaldéhyde puis déshydratés dans de l'éthanol et du xylène. Les trois fragments de chaque série ont ensuite été inclus dans des blocs de paraffine. Puis ces blocs ont été sectionnés en coupes sériées de 10 µm jusqu'à épuisement des blocs, avant d'être colorés selon la technique de coloration standard HES (Hématéine Eosine Safran).

2.6 Méthode d'analyse

Notre analyse s'est basée sur l'évaluation histologique de fragments de cortex pris au hasard dans chacune des séries de chaque culture. Les coupes des fragments analysés ont été examinées à l'aide d'un microscope optique.

Les follicules ont été classés selon leurs stades de développement (Gougeon, 1986), basés sur la morphologie des cellules de la granulosa :

- (1) stade primordial : ovocyte entouré par quelques cellules plates de la granulosa,
- (2) stade intermédiaire : ovocyte entouré par des cellules plates et au moins une cellule de la granulosa cuboïde,

- (3) stade primaire : ovocyte entouré par une couche complète de cellules de la granulosa cuboïdes,
- (4) stade secondaire : ovocyte entouré par deux ou plus couches complète de cellules de la granulosa cuboïdes,
- (5) stade antral : présence d'une cavité antrale au sein des multiples couches folliculaires.

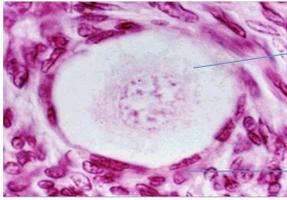
Les follicules ont été comptés et classés à partir du moment où le nucléole était visible pour éviter les doublons.

Les données ont été exprimées en proportion globale de chaque stade présent avant et après culture.

Les follicules présentant un ovocyte ayant une chromatine condensée et un cytoplasme acidophile, ainsi que des cellules folliculaires pycnotiques, ont été considérés en atresie (Gougeon, 1986).

Les follicules n'ayant pas ces caractéristiques ont été considérés comme non atrésiques ou actifs.

Follicule primordial

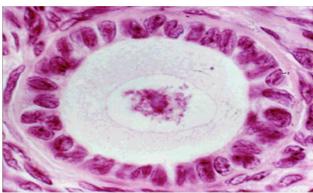


OVOCYTE I

cellules folliculaires aplaties

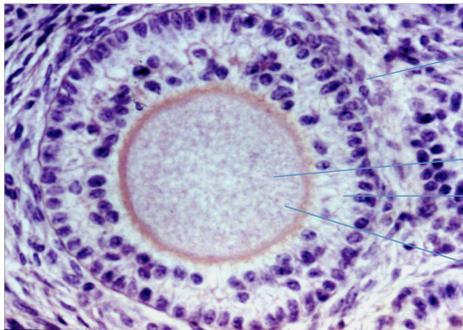
Initiation de la croissance
Augmentation de volume de l'ovocyte

Follicule primaire



Une couronne de cellules folliculaires cuboïdes

Follicule secondaire



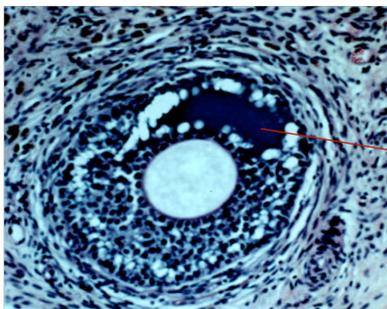
Cellules des thèques

OVOCYTE I

Cellules de la granulosa

Épaississement de la zone
pellucide

Follicule antral ou tertiaire



antrum

RESULTATS

Les résultats sont issus de fragments de cortex pris de façon aléatoire dans les séries de chaque culture aux différents temps. Ils ne sont donc qu'une estimation de la croissance et de la survie des follicules car ils sont fonction des différences de richesse folliculaire inter-fragments.

Au cours de la culture, nous avons observé que le stroma adjacent aux follicules se nécrosait petit à petit quelle que soit la culture. Par contre cette nécrose était plus importante dans les séries contenant du sérum fœtal humain et moins marquée dans les milieux avec de l'Amniomax-II.

Dans certains follicules ayant atteint le stade primaire ou secondaire nous avons noté une prolifération anarchique (asymétrique) des cellules de la granulosa avec un pôle présentant plusieurs couches et un pôle avec une couche unique de cellules. Certains follicules présents étaient également dépourvus d'ovocyte ou avec un ovocyte en très mauvais état.

De manière générale dans les 3 cultures on remarque une baisse de la survie folliculaires, quels que soit leurs stades, dès la mise en culture.

1. CULTURE N°1

Les résultats de la culture sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7. Résultats de la culture n°1 - n (%)

Culture no 1		SERIE A		SERIE B		SERIE C	
		n (%)		n (%)		n (%)	
		actif	atrésie	actif	atrésie	actif	atrésie
J0	FP	9 (60)		9 (60)		9 (60)	
	F1	5 (40)		5 (40)		5 (40)	
	F2	0 (0)		0 (0)		0 (0)	
J4	FP	2 (12)	15 (88)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	5 (10)	44 (90)	0 (0)	31 (100)	0 (0)	25 (100)
	F2	1 (17)	5 (83)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	4 (100)
J7	FP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	9 (14)	54 (86)	0 (0)	11 (100)	0 (0)	52 (100)
	F2	1 (12,5)	7 (87,5)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	8 (100)
J14	FP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	0 (0)	20 (100)	0 (0)	8 (100)	0 (0)	5 (100)
	F2	0 (0)	2 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	2 (100)

Les sections histologiques des fragments de cortex ovariens congelés/décongelés montrent à J0 que 60% des follicules comptés sont au stade primordial et que 40% sont au stade primaire. On ne visualise aucun follicule secondaire.

Le pourcentage de follicules primordiaux a été diminué de 60% à 24% au 4^{ème} jour pour la série A. En revanche la mise en croissance a été plus rapide dans les séries B et C puisque le taux de follicules primordiaux est passé de 60% à 5% dans la série B et à 0% dans la série C.

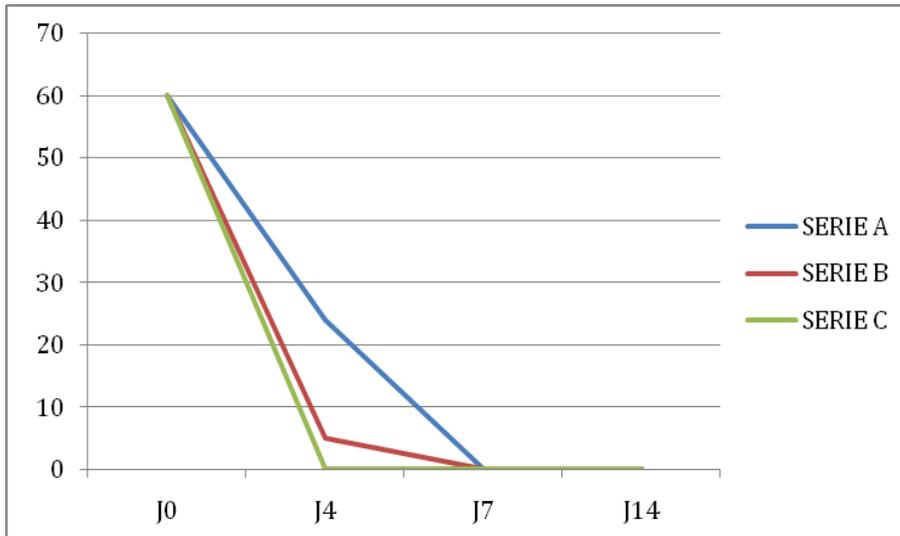


Figure 6. Distribution des follicules primordiaux des séries A B et C de la culture no 1 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série A, les follicules primordiaux disparaissent à partir de J7 et les follicules primaires augmentent de 40% (J0) à 68% (J4), et ce taux ne cesse d'augmenter puisque à J7 il est de 89% et à J14 il est à 91%. Le taux de follicules secondaires par contre stagne : J4 8%, J7 11%, J14 9%.

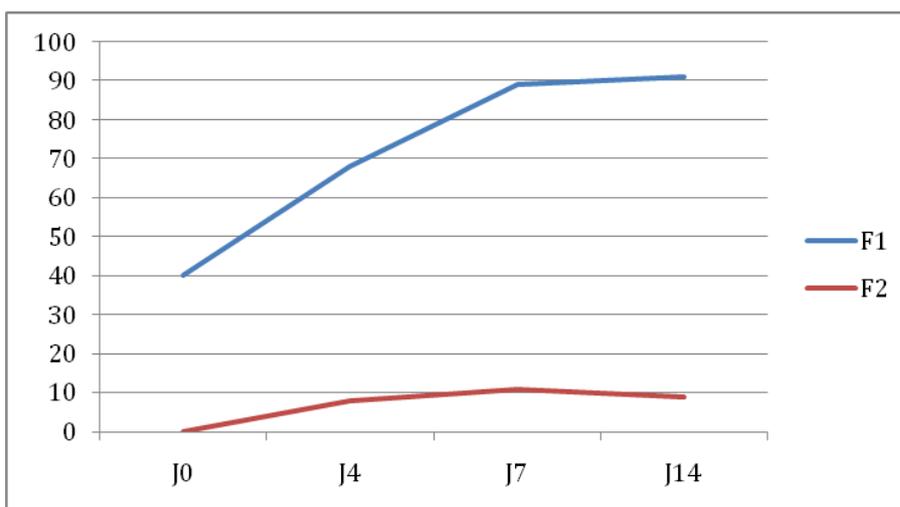


Figure 7. Distribution des follicules primaires (F1) et secondaires (F2) de la série A de la culture no 1 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série B, les follicules primordiaux disparaissent eux aussi à J7 et les follicules primaires passent de 40% à J0 à 82% à J4. Dans cette série les follicules secondaires augmentent de J4 (13%) à J7 (31%) puis diminuent : J14 (11%).

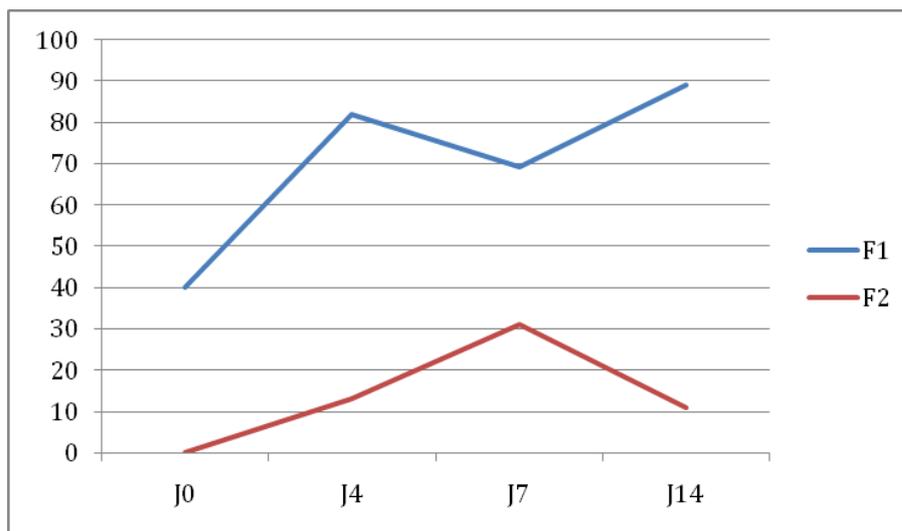


Figure 8. Distribution des follicules primaires (F1) et secondaires (F2) de la série B de la culture no 1 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série C, le taux de follicules primaires augmente sensiblement de J0 (40%) à J4 (86%) puis ce taux plafonne à J7 (87%) pour diminuer à J14 (71%) au profit des follicules secondaires. Le taux de follicule secondaire stagne de J4 (14%) à J7 (13%) et augmente faiblement à J14 (29%) mais il s'agit ici de très faibles effectifs.

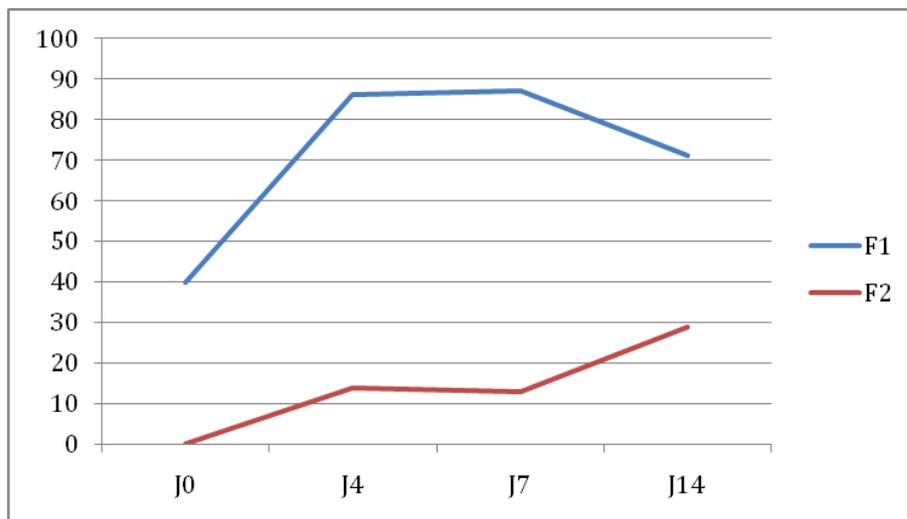


Figure 9. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série C de la culture no 1 en fonction du temps (pourcentages).

Pour ce qui est de la survie, celle ci est nulle dès J4 pour les séries B et C quel que soit le type de follicule : primaire ou secondaire. La survie est légèrement meilleure dans la série A jusqu'à J7 : 10% de follicules primaires actifs à J4 et 14% à J7, et 17% de follicules secondaires actifs à J4 et 12,5% à J7.

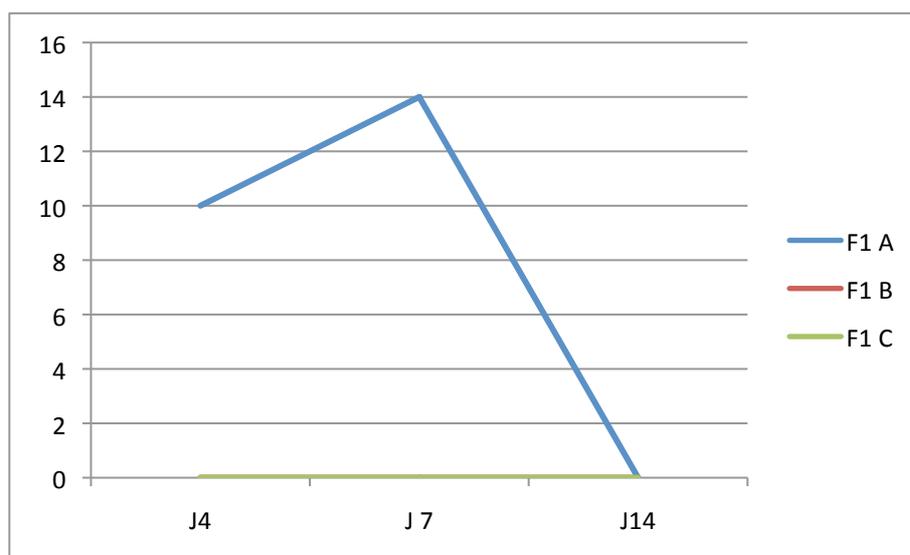


Figure 10. Distribution des follicules actifs primaires de la série A, B et C de la culture no 1 en fonction du temps (pourcentages).

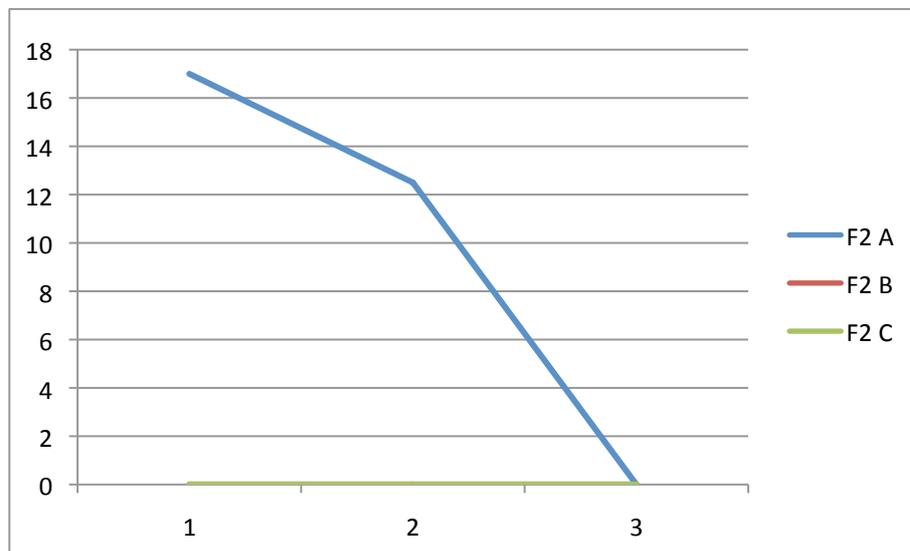


Figure 11. Distribution des follicules actifs secondaires de la série A, B et C de la culture no 1 en fonction du temps (pourcentages).

D'autre part, durant la culture nous avons remarqué une apoptose rapide au cours du temps, des cellules du stroma des fragments de cortex ovarien et des cellules de la granulosa des follicules, dans toutes les séries de la culture, mais celle-ci est plus franche dès J4 dans les séries B et C.

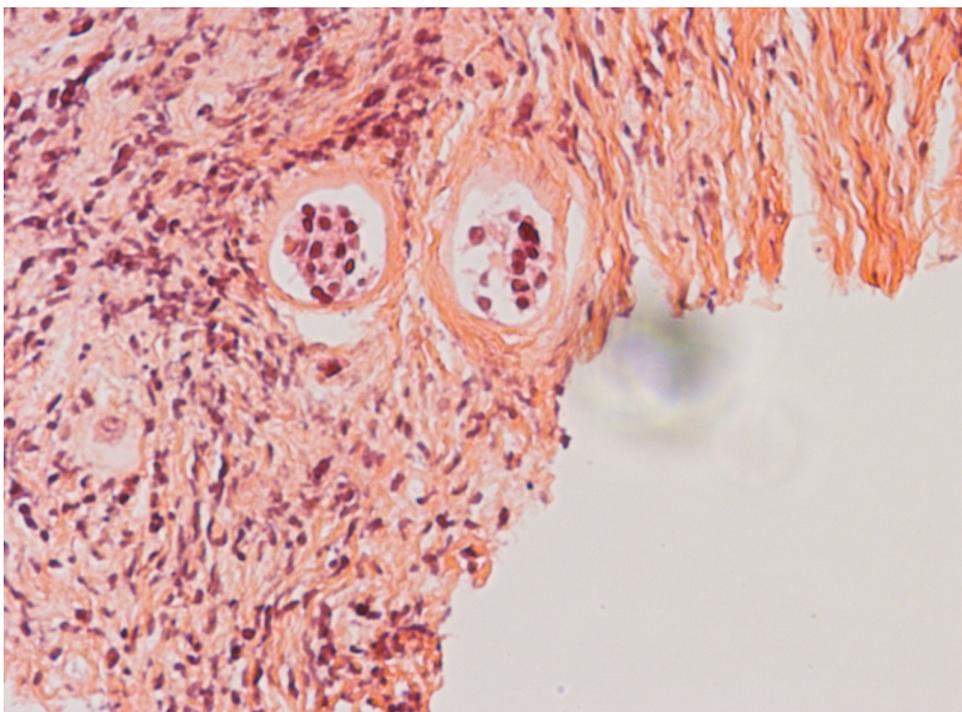


Figure 12. Morphologie du tissu ovarien dans la série C à J4 de la culture : follicules en atresie avec des anomalies nucléaires et cytoplasmiques des cellules du stroma et de la granulosa déjà très nombreuses

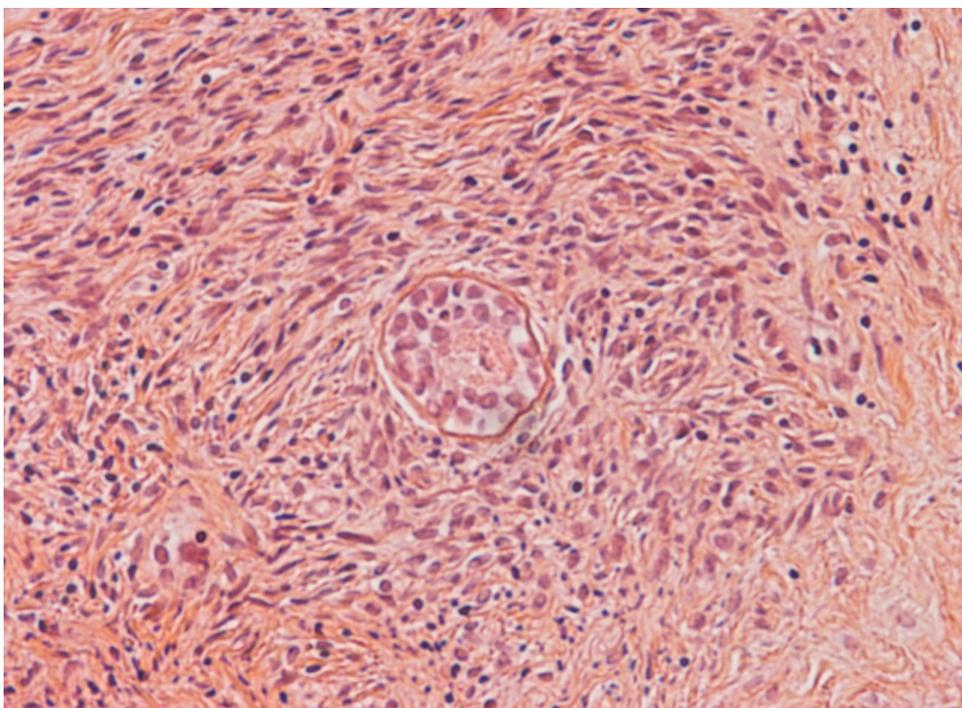


Figure 13. Morphologie du tissu ovarien dans la série A à J4 de la culture : follicule secondaire en atresie

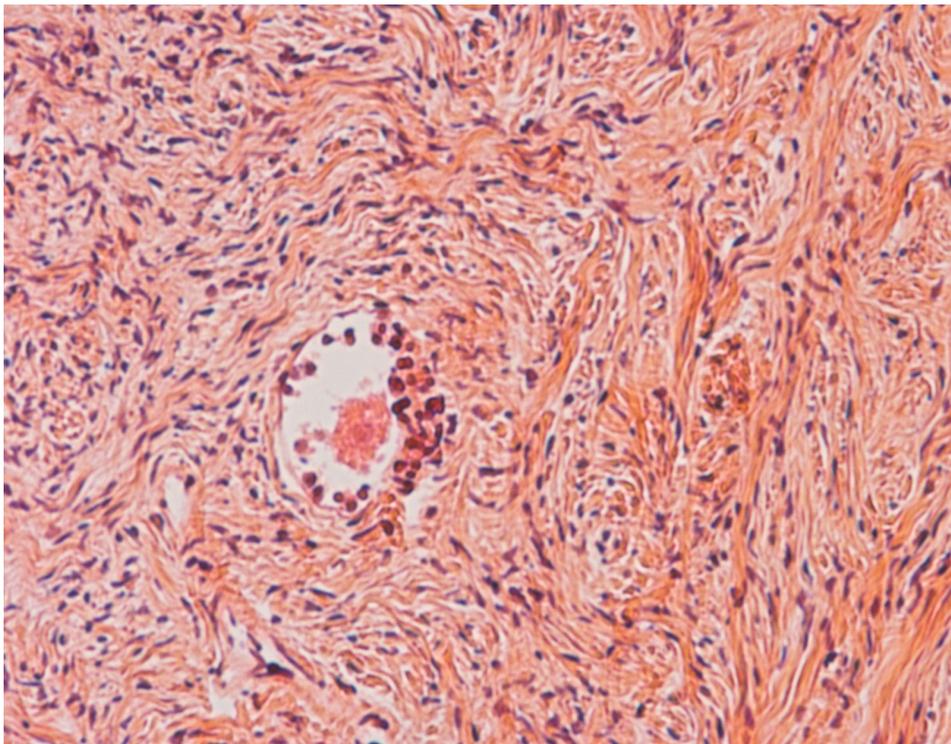


Figure 14. Morphologie du tissu ovarien dans la série B à J4 de la culture : follicule secondaire en atresie

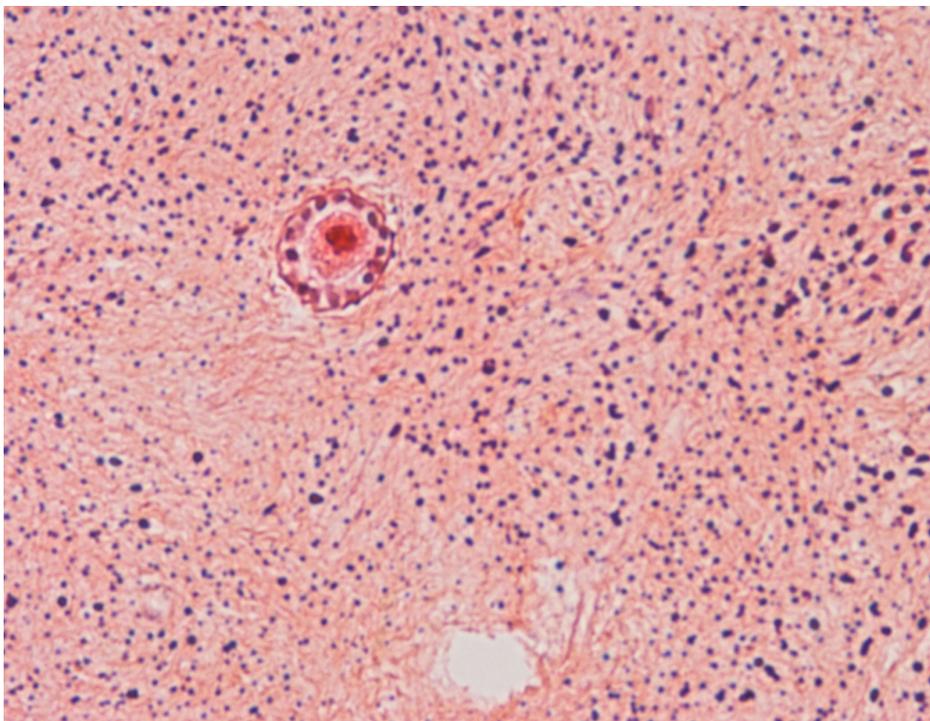


Figure 15. Morphologie du tissu ovarien dans la série C à J4 de la culture : follicule primaire en atresie avec un stroma adjacent très altéré

2. CULTURE N°2

Les résultats de la culture sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats de la culture n°2 – n (%)

Culture no 2		SERIE A n (%)		SERIE B n (%)		SERIE C n (%)		SERIE D n (%)	
		actif	atrésie	actif	atrésie	actif	atrésie	actif	atrésie
J0	FP	27 (71)		27 (71)		27 (71)		27 (71)	
	F1	11 (29)		11 (29)		11 (29)		11 (29)	
	F2	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
J4	FP	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	0 (0)	6(100)	2 (18)	9 (82)	2 (29)	5 (71)	3 (13)	20 (87)
	F2	0 (0)	1(100)	3 (75)	1 (25)	3 (60)	2 (40)	1 (25)	3 (75)
J7	FP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0°)	0 (0)	0 (0)
	F1	3 (20)	12(80)	1 (6)	17 (94)	0 (0)	6 (100)	8 (30)	19 (70)
	F2	0 (0)	2(100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (11)	8 (89)
J14	FP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	0 (0)	7(100)	0 (0)	13 (100)	0 (0)	3 (100)	3 (11)	25 (89)
	F2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)

Les sections histologiques des fragments de cortex ovariens congelés/décongelés montrent à J0 que 71% des follicules comptés sont au stade primordial et que 29% sont au stade primaire. On ne visualise pas de follicule secondaire.

Le pourcentage de follicules primordiaux a été diminué de 71% à 0% dès le 4^{ème} jour pour toutes les séries de la culture.

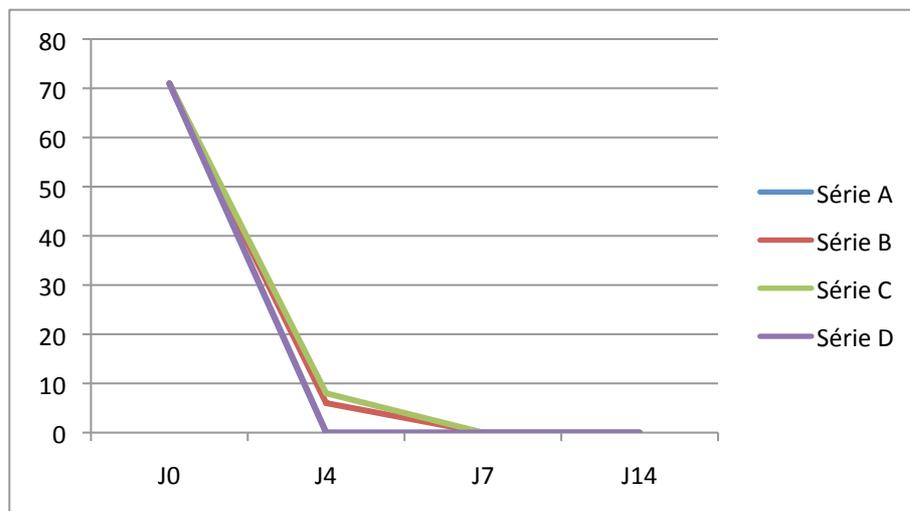


Figure 16. Distribution des follicules primordiaux des séries A,B,C,D de la culture no 2 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série A, les follicules primaires ont augmenté de manière explosive de 29% (J0) à 86% (J4), puis ce taux stagne de J4 à J7 (88%) et de J7 à J14 (100%) et on ne note pas de poursuite de croissance puisque le taux de follicules secondaires ne dépasse pas 14% (J4).

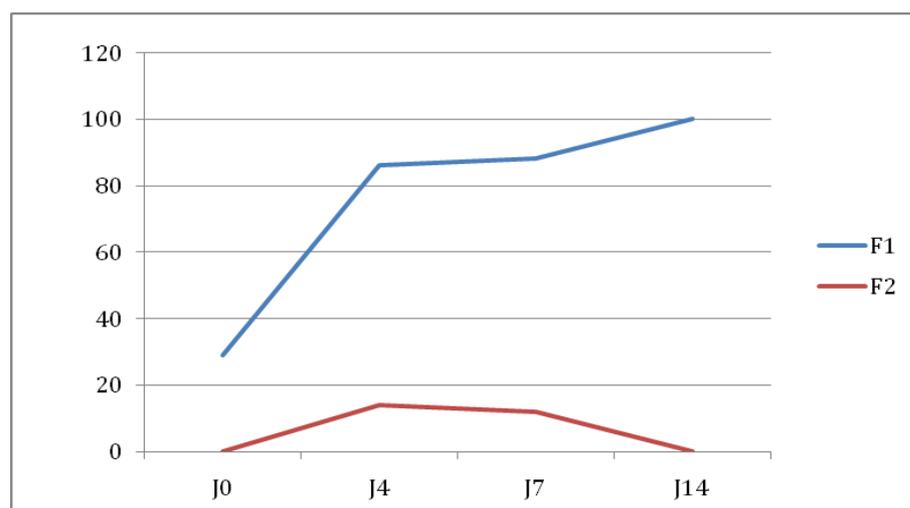


Figure 17. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série A de la culture no 2 en fonction du temps (pourcentages.)

Dans la série B, les follicules primaires augmentent de 29% (J0) à 73% (J4) puis de 90% (J7) à 100% (J14). Dans cette série les follicules secondaires diminuent dans le temps : 27% (J4), 10% (J7), 0% (J14).

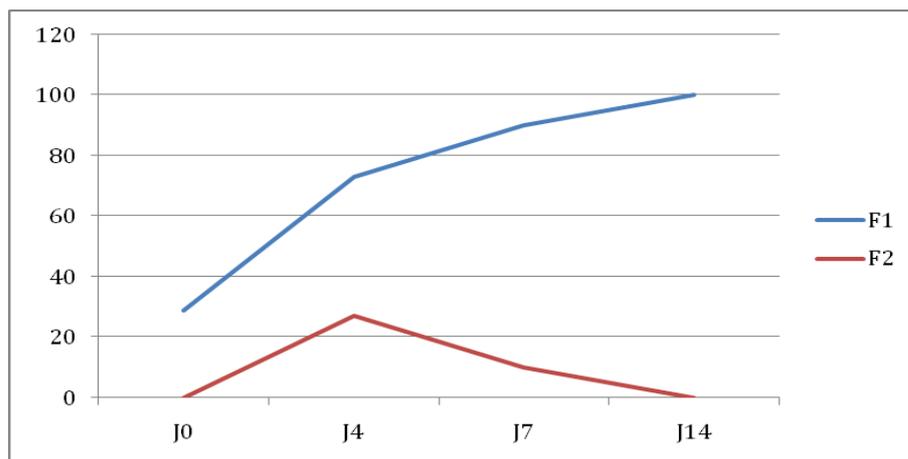


Figure 18. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série B de la culture no 2 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série C, le taux de follicules primaire augmente de J0 (29%) à J4 (58%) et ce pourcentage continue d'augmenter à J7 (100%) et à J14 (100%) au dépend du taux de follicule secondaire qui diminue brutalement de J4 (42%) à J7-J14 (0%).

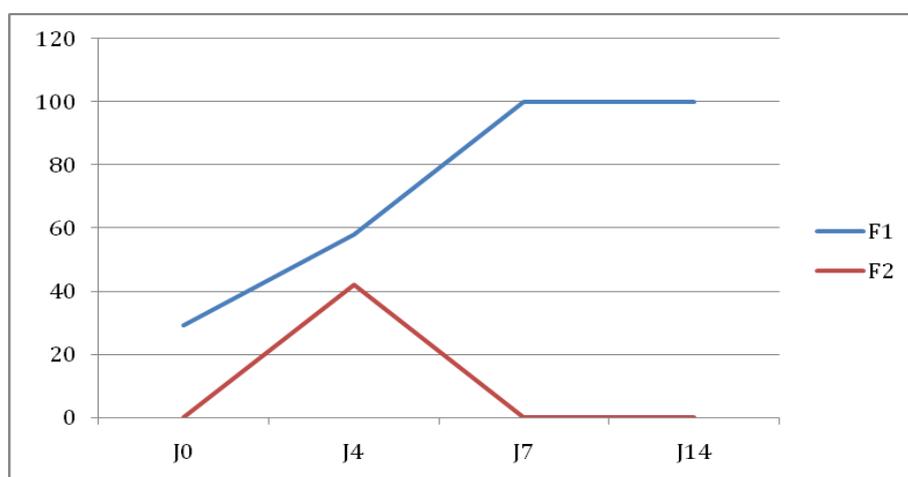


Figure 19. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série C de la culture no 2 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série D, les follicules primaires ont augmentés de manière importante de 29% (J0) à 85% (J4), par contre leur taux diminue de J4 à J7 (75%) au profit de l'apparition de follicules secondaires : 15% à J4 et 25% à J7. A J14 il y a persistance de la croissance contrairement aux autres séries car il y a toujours présence de follicules secondaires (12,5%).

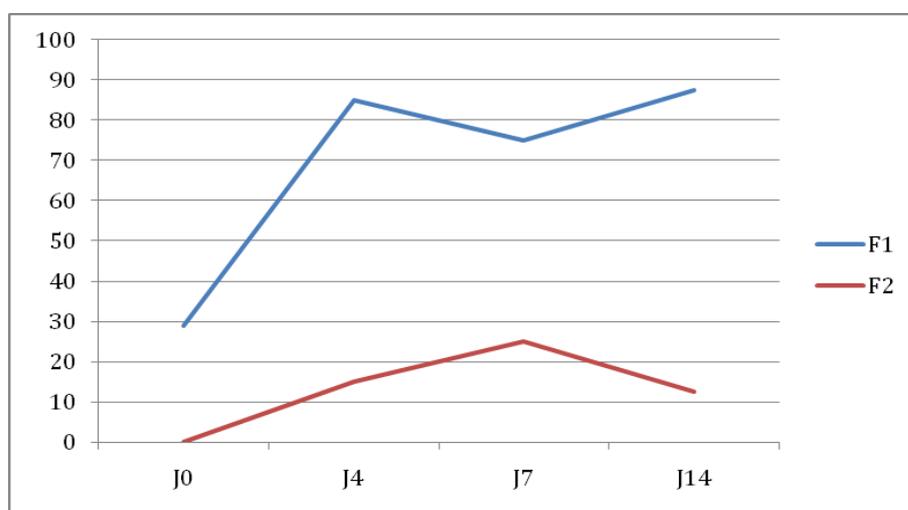


Figure 20. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série D de la culture no 2 en fonction du temps (pourcentages).

La survie dans la série A est pratiquement nulle sauf pour les follicules primaires à J4 mais ce résultat doit être dû à la variabilité de la richesse folliculaire inter-fragments des cortex. Le taux de survie de la série B est meilleur que la série A à J4 : 18% et 75% pour les follicules primaires et secondaires puis la survie devient médiocre.

Dans la série C, comme la série B, la survie ne persiste que jusqu'à J4.

Le taux de survie de la série D est meilleur avec une survie encore présente des follicules primaires à J14 (11%) et des follicules secondaires à J7 (11%).

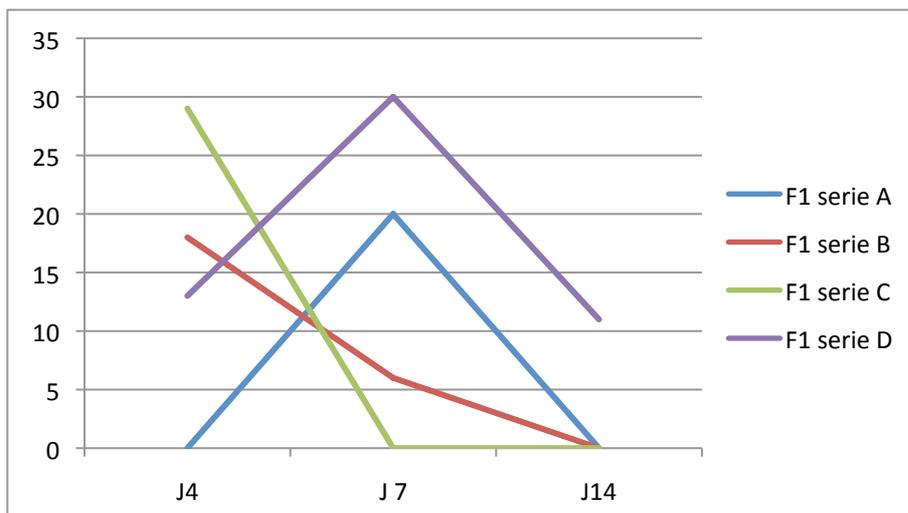


Figure 21. Distribution des follicules actifs primaires de la série A,B,C,D de la culture no 2 en fonction du temps (pourcentages).

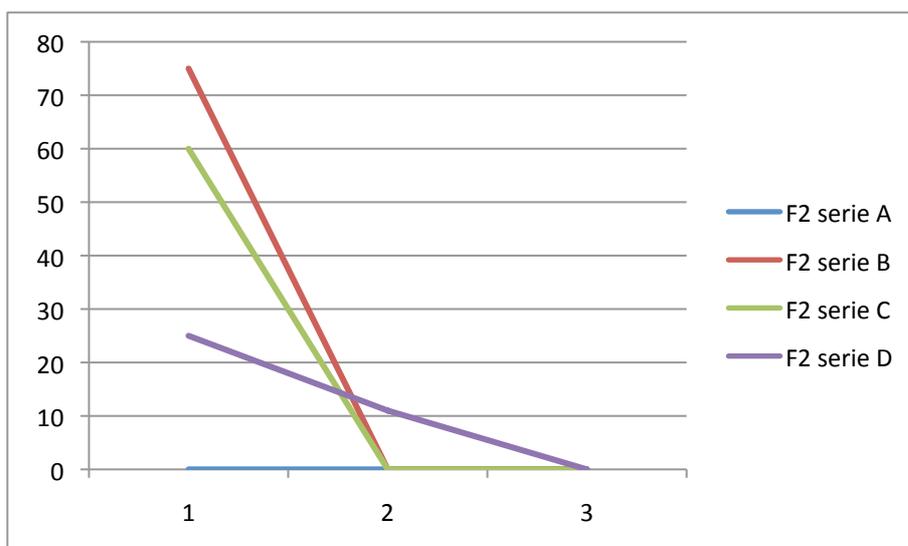


Figure 22. Distribution des follicules actifs secondaires de la série A,B,C,D de la culture no 2 en fonction du temps (pourcentages).

D'autre part, durant la culture nous avons remarqué, dans toutes les séries de la culture, une apoptose rapide et très marquée du stroma des cortex ovarien. Celle ci était légèrement moins marquée dans la série D.

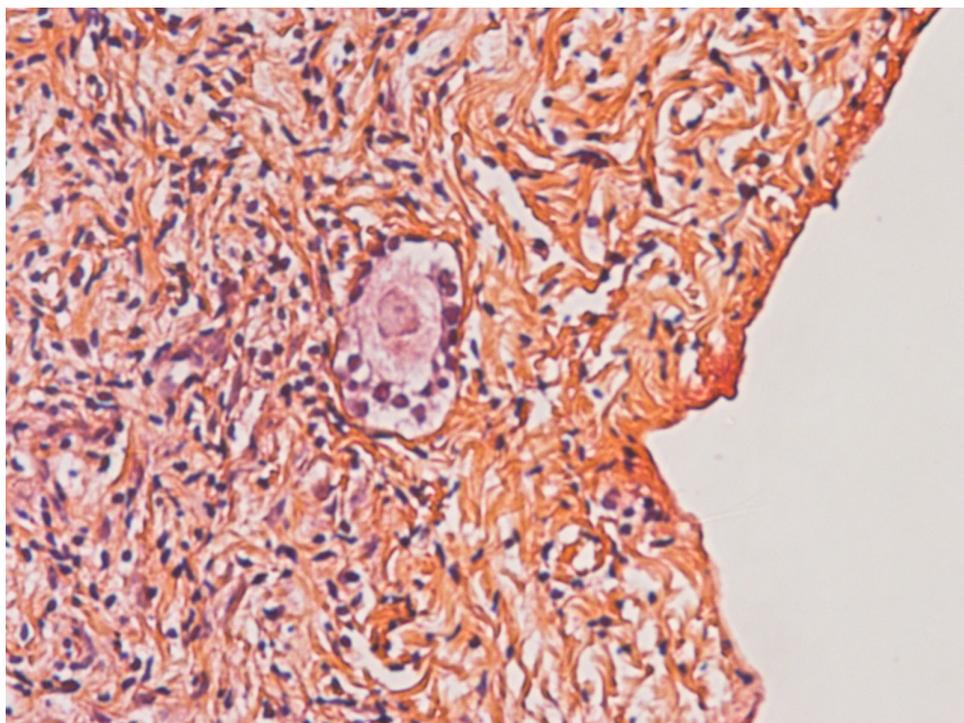


Figure 23. Morphologie du tissu ovarien dans la série D à J4 de la culture : follicule secondaire en atresie avec de nombreuses anomalies nucléaires et cytoplasmiques des cellules du stroma et de la granulosa

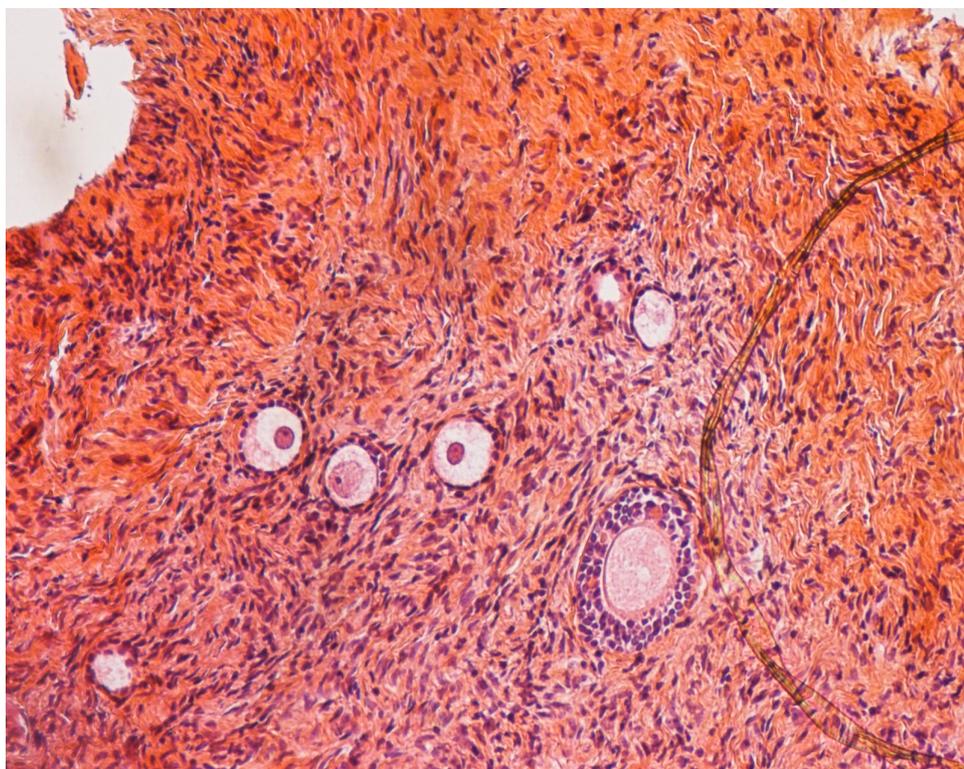


Figure 24. Morphologie du tissu ovarien dans la série B à J4 de la culture : follicules primordial, primaires et secondaire actifs – noyaux et granulosa de bonnes qualités mais stroma déjà en voie d'atresie

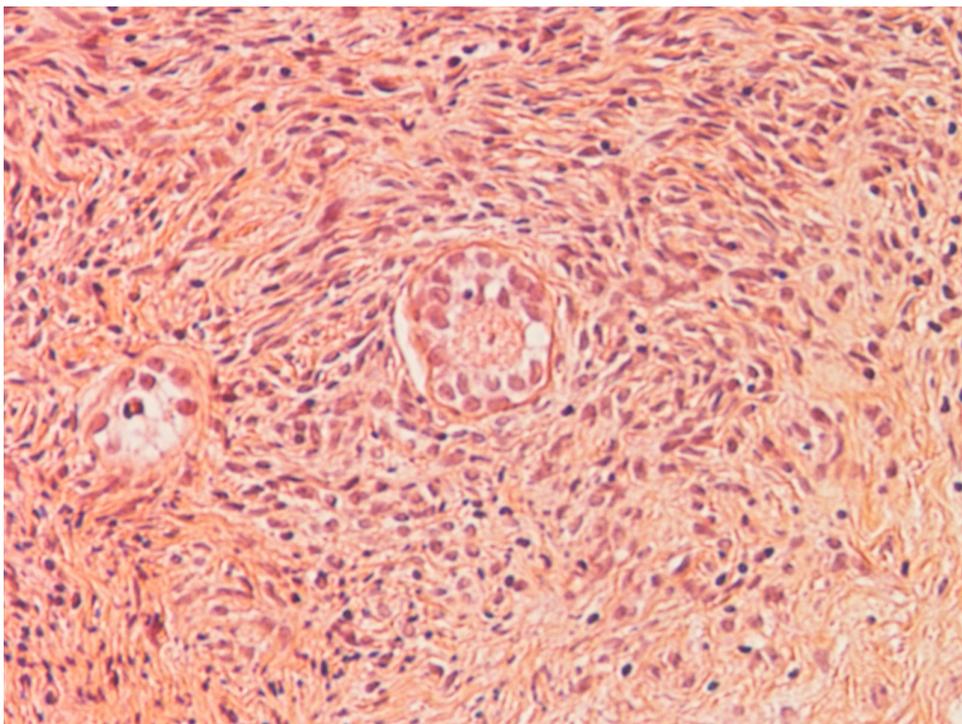


Figure 25. Morphologie du tissu ovarien dans la série A à J4 de la culture : follicules primaires et secondaires en atrésie

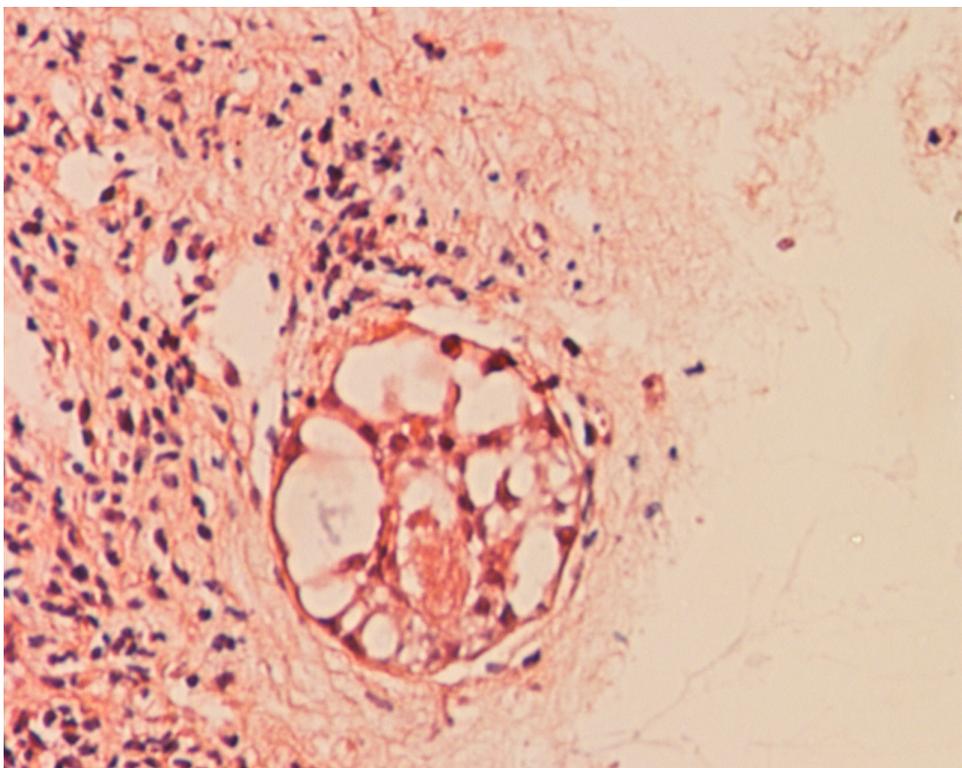


Figure 26. Morphologie du tissu ovarien dans la série C à J7 de la culture : follicule en atrésie

3. CULTURE N°3

Les résultats de la culture sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9. Résultats de la culture n°3 – n(%)

Culture n°3		SERIE A n (%)		SERIE B n (%)		SERIE C n (%)	
		actif	atrésie	actif	atrésie	actif	atrésie
J0	FP	2 (67)		2 (67)		2 (67)	
	F1	1 (33)		1 (33)		1 (33)	
	F2	0 (0)		0 (0)		0 (0)	
J4	FP	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	2 (14)	12 (86)	12 (34)	23 (66)	7 (26)	20 (74)
	F2	0 (0)	1 (100)	2 (40)	3 (60)	1 (20)	4 (80)
J7	FP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	3 (20)	12 (80)	7 (28)	18 (72)	10 (28)	26 (72)
	F2	2 (50)	2 (50)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	4 (100)
J14	FP	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	F1	10 (24)	31 (76)	6 (24)	19 (76)	6 (33)	12 (77)
	F2	4 (36)	7 (64)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)

Les sections histologiques des fragments de cortex ovariens congelés/décongelés montrent à J0 que 67% des follicules comptés sont au stade primordial alors que 33% sont au stade primaire. Aucun follicule secondaire n'a été visualisé.

Le pourcentage de follicules primordiaux a été diminué de 67% à 0% dès le 4^{ème} jour pour toutes les séries de la culture.

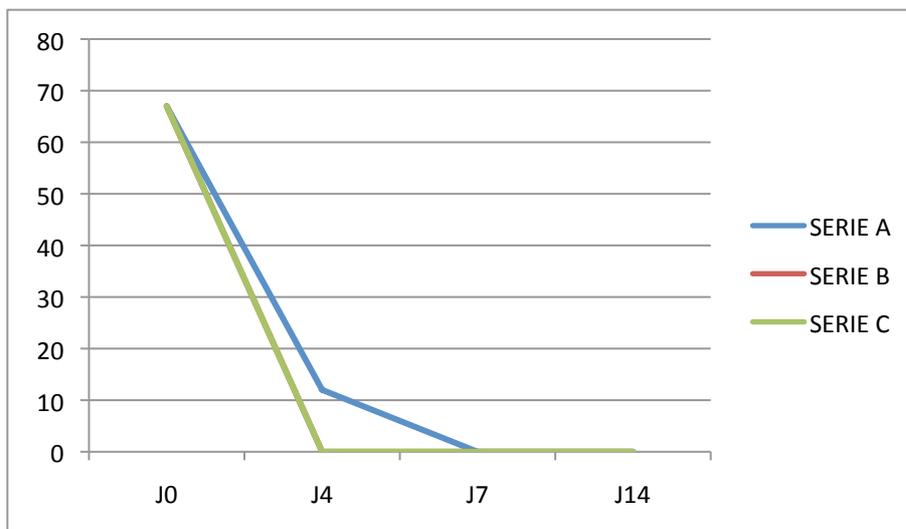


Figure 27. Distribution des follicules primordiaux des séries A, B et C de la culture no 3 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série A, les follicules primaires ont augmenté de manière brutale de 33% (J0) à 82% (J4), par contre leur taux diminue puis stagne de J4 à J7 (79%) et de J7 à J14 (79%) au profit de l'apparition de follicules secondaires : 6% à J4 à 21% à J7 et J14.

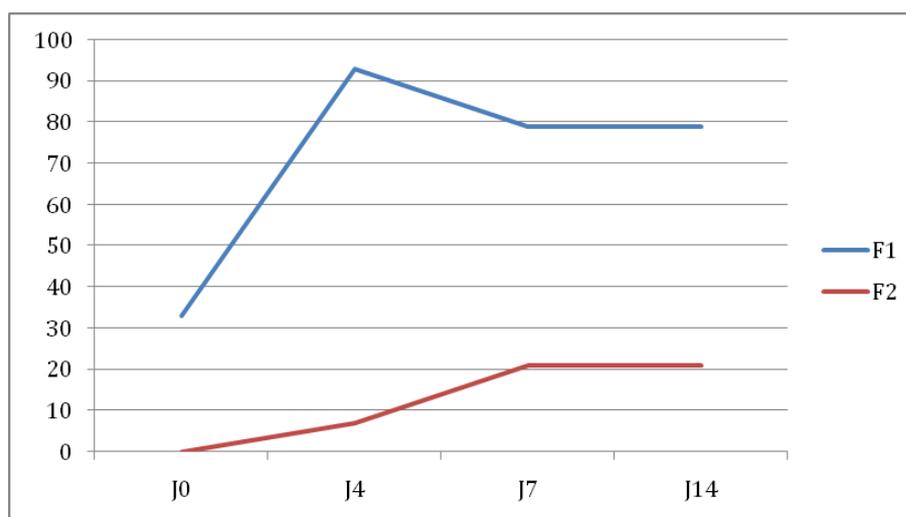


Figure 28. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série A de la culture no 3 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série B, les follicules primaires passent de 33% (J0) à 87,5% (J4) puis stagnent à 96% (J7) et 93% (J14). Dans cette série les follicules secondaires diminuent dans le temps : J4 (12,5%) à J7 (4%) puis plafonnent : J14 (7%).

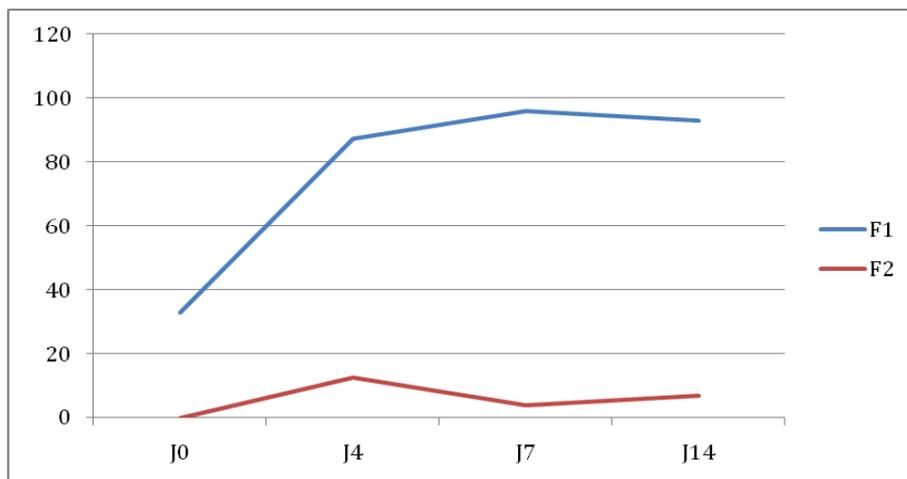


Figure 29. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série B de la culture no 3 en fonction du temps (pourcentages).

Dans la série C, le taux de follicules primaire augmente aussi de manière sensible de J0 (33%) à J4 (84%) et ce pourcentage continue d'augmenter à J7 (90%) et à J14 (100%) car le taux de follicule secondaire diminue progressivement de J4 (16%) à J14 (0%).

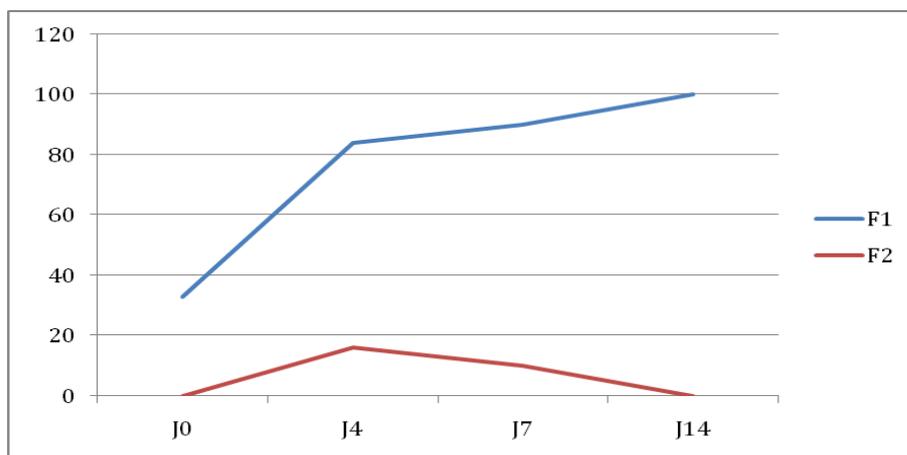


Figure 30. Distribution des follicules primaires et secondaires de la série C de la culture no 3 en fonction du temps (pourcentages).

Il n'y a pas de différence sensible du taux de follicules primaires actifs à J4 quelle que soit la série et ceux ci restent stables dans le temps avec une tendance à l'élévation pour les séries A et C et plutôt à la décroissance pour la série B.

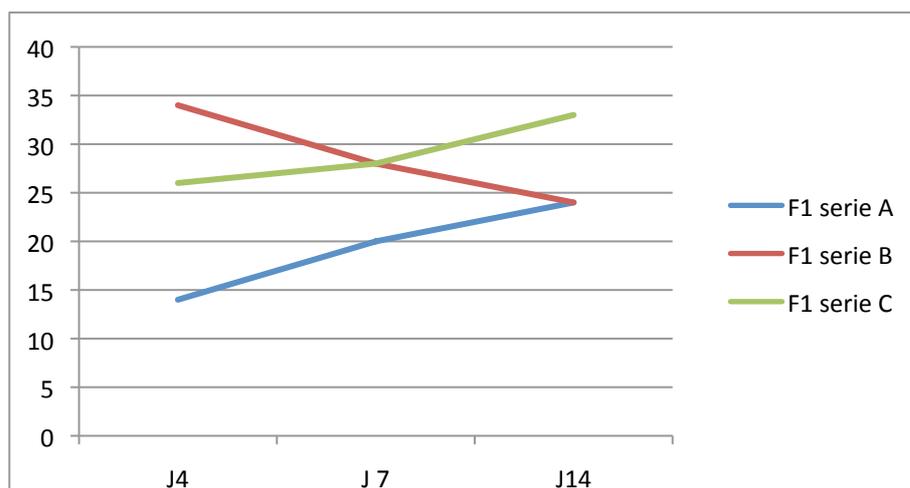


Figure 31. Distribution des follicules actifs primaires de la série A,B,C de la culture no 3 en fonction du temps (pourcentages).

Par contre le taux d'activité des follicules secondaires semble être croissant de J4 à J7 puis se stabilise à J14 pour la série A alors que dans les deux autres séries ce taux chute sur la même période.

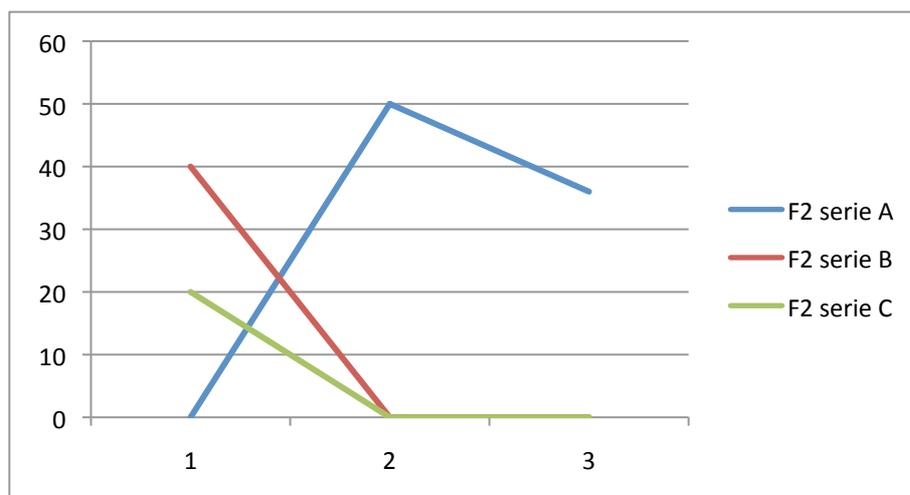


Figure 32. Distribution des follicules actifs secondaires de la série A,B,C de la culture no 3 en fonction du temps (pourcentages).

Bien qu'il soit en atresie, on note dans la série A la présence d'un follicule secondaire pré-antral à J14.

D'autre part, durant la culture nous avons remarqué une apoptose moins marquée que dans les autres cultures, des cellules stromales des cortex ovarien ainsi que des cellules de la granulosa ; et ceci malgré l'atresie de l'ovocyte. Au sein de la culture, il semble que c'est dans la série A que cette dégradation est la moins importante.

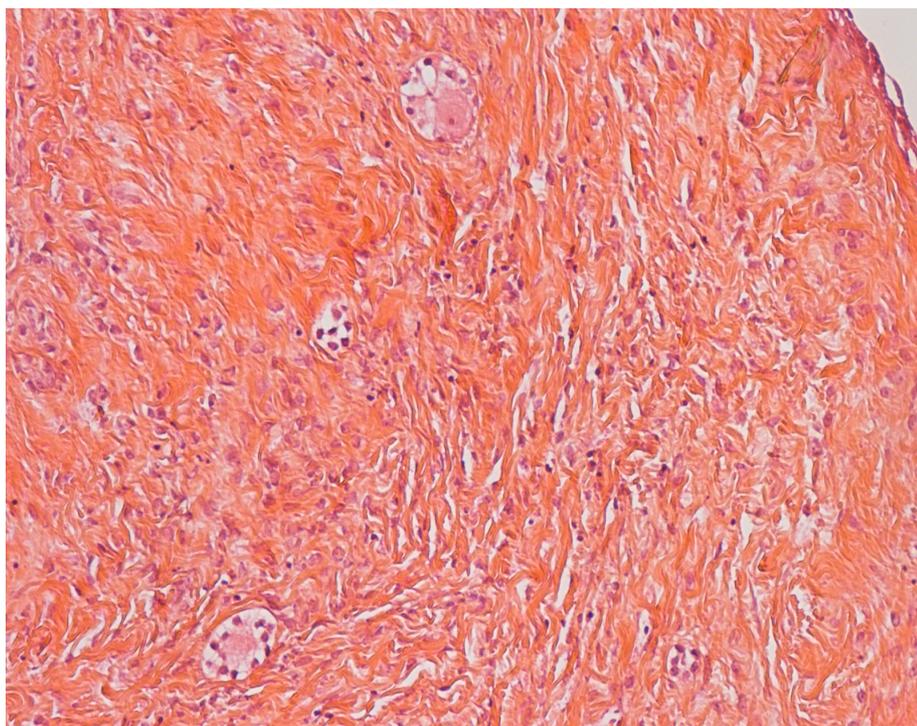


Figure 33. Morphologie du tissu ovarien dans la série C à J7 de la culture : petits follicules en atresie

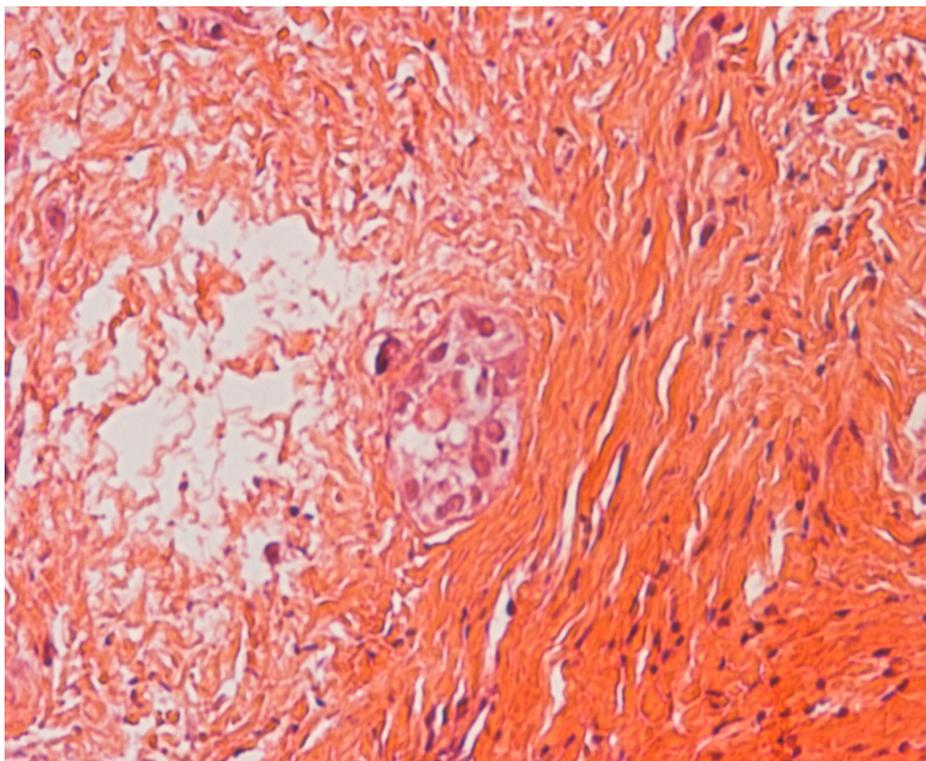


Figure 34. Morphologie du tissu ovarien dans la série B à J4 de la culture : follicule secondaire en atresie

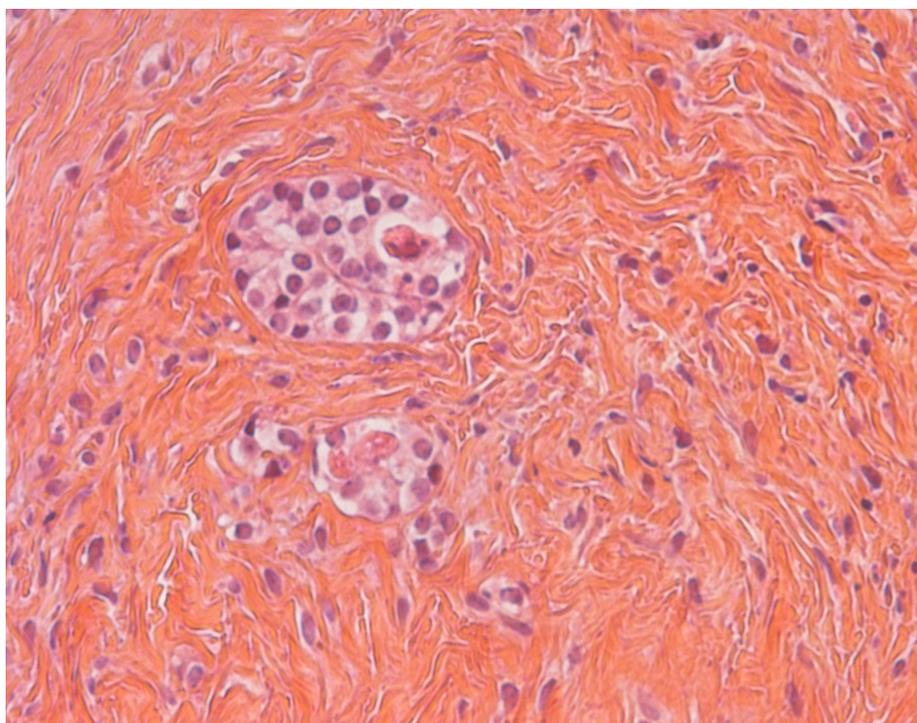


Figure 35. Morphologie du tissu ovarien dans la série A à J14 de la culture : follicule secondaire encore actif à ce temps de la culture

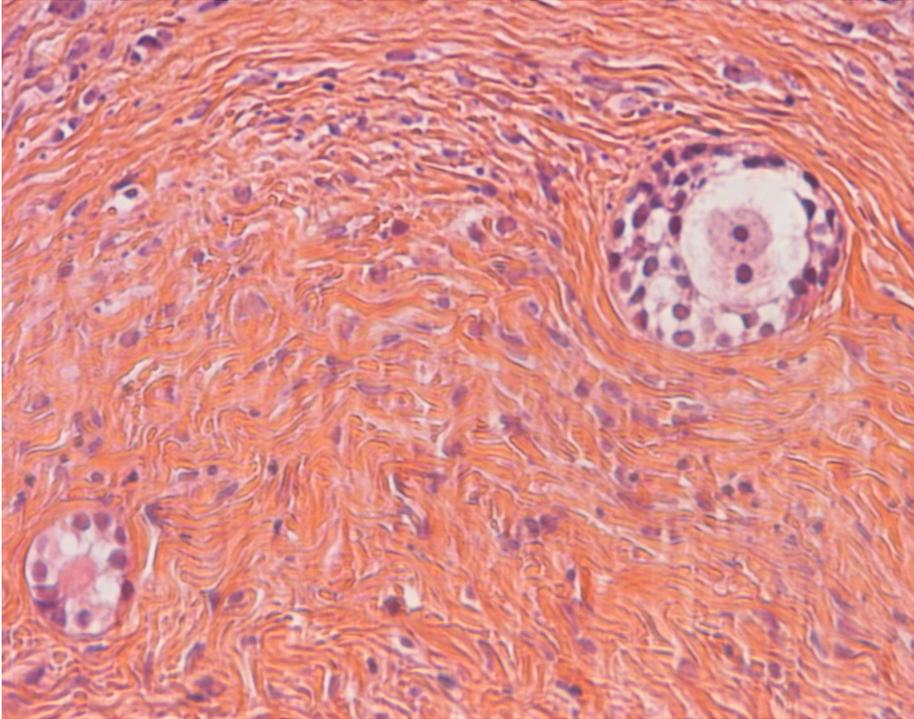


Figure 36. Morphologie du tissu ovarien dans la série A à J14 de la culture : follicule secondaire actif

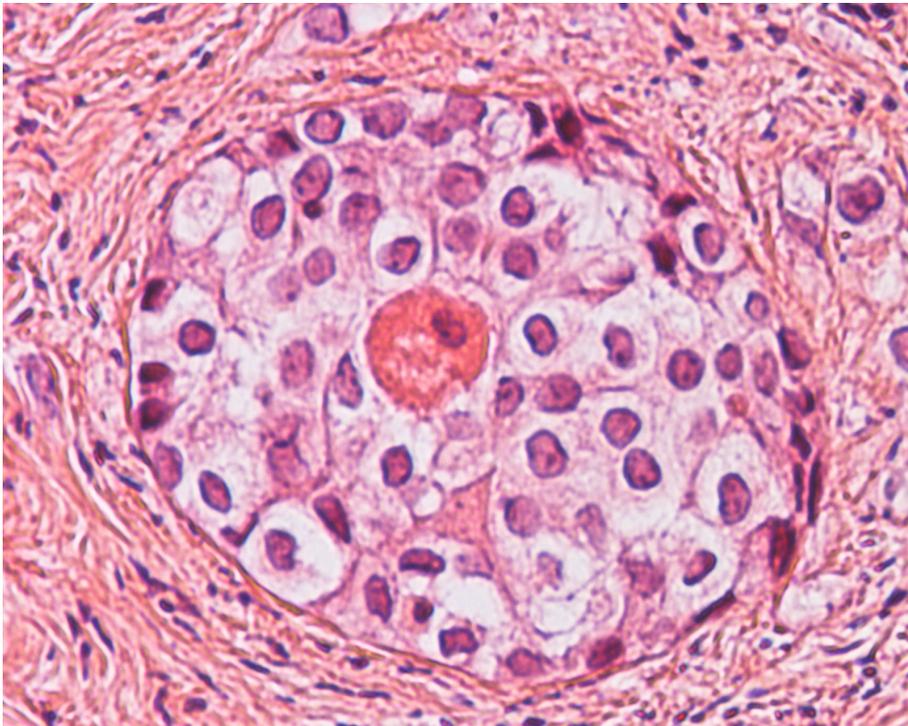


Figure 37. Morphologie du tissu ovarien dans la série A à J4 de la culture : follicule secondaire actif de (x40) – cellules de la granulosa bien régulières, noyau condensé

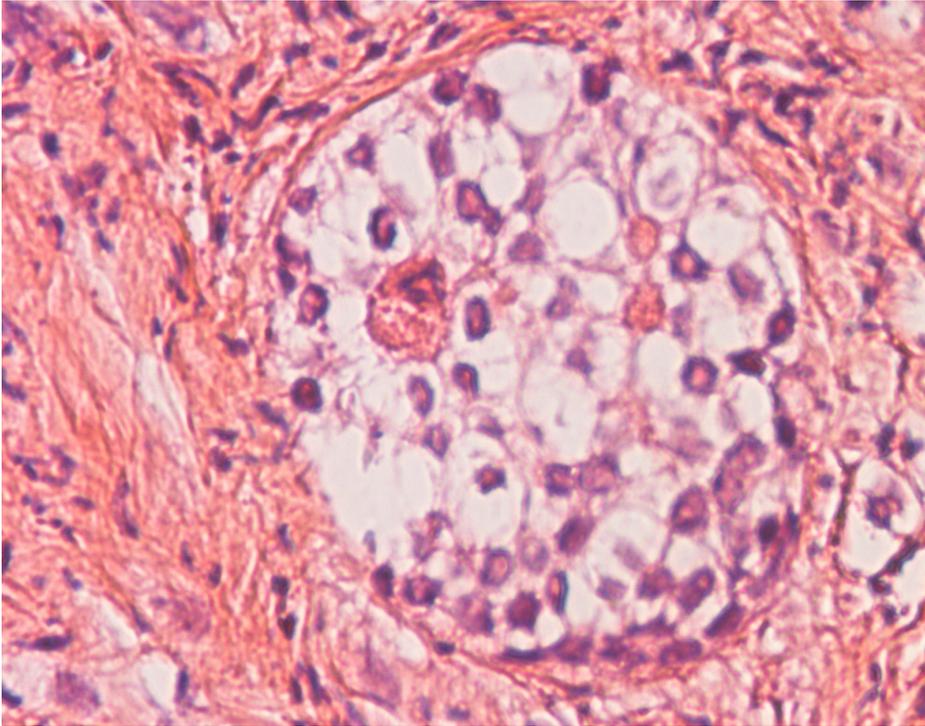


Figure 38. Morphologie du tissu ovarien dans la série A à J14 de la culture : follicule secondaire pré-antral en atresie (x40)

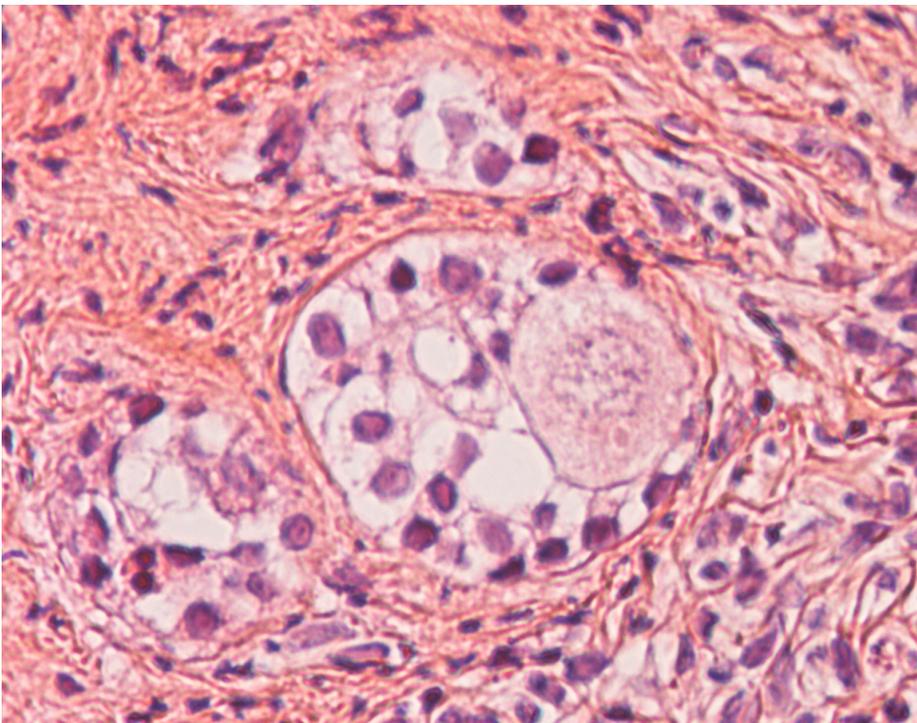


Figure 39. Morphologie du tissu ovarien dans la série A à J7 de la culture : follicule secondaire en atresie avec un ovocyte excentré (x40)

4. COMPARAISON DES RESULTATS

Nous avons extrait des résultats de chaque culture, les meilleurs taux de follicules secondaires actifs de J0 à J4, puis de J4 à J14.

A J0, aucun follicule secondaire n'a été visualisé dans aucune des cultures.

A J4, dans la culture n°1, les taux de follicules secondaires actifs sont de 17% pour la série A, 0% pour les séries B et C.

Dans la culture n°2, ce taux est de 0% dans le série A, 75% dans la série B, 60% dans la série C, et 25% dans la série D.

Dans la série n°3, il est à 0% dans la série A, 40% dans la série B, et 20% dans la série C.

Les meilleurs taux de follicules secondaires actifs retrouvés à J4 sont:

- pour la culture n°1 : dans les milieux de la série A (C1SA)
- pour la culture n°2 : dans les milieux de la série B (C2SB)
- pour la culture n°3 : dans les milieux de la série B (C3SB)

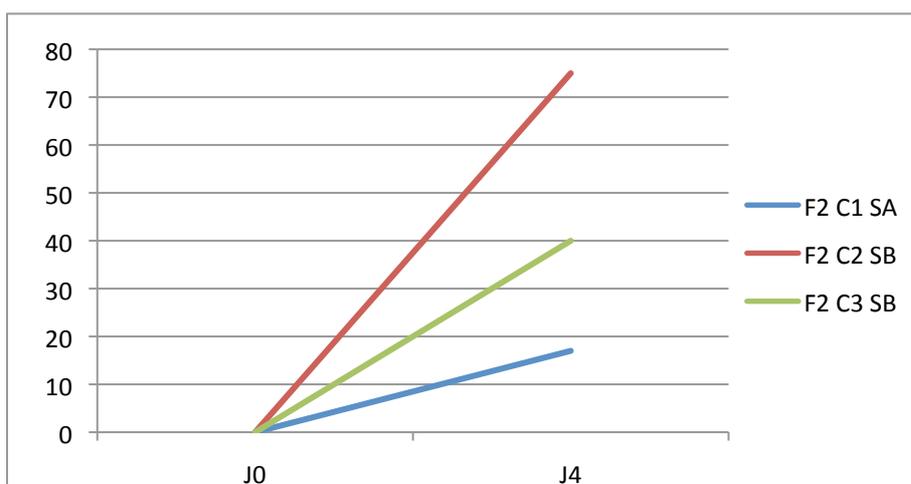


Figure 40. Comparatif des meilleures séries des 3 cultures : C1SA, C2SB, C3SB en fonction du taux de follicules secondaires (F2) actifs de J0 à J

De J4 à J14 les meilleurs taux de follicules secondaires actifs ne se retrouvent pas dans les mêmes séries que précédemment, à l'exception de la culture n°1.

En effet dans la culture n°1, à tous les temps de la culture, les follicules secondaires actifs n'ont été visualisés que dans la série A.

Dans la culture n°2, malgré un taux de follicules secondaires actifs de la série B important à J4, celui-ci s'effondre dès J7 (0%). Par contre la série D est la seule qui comporte des follicules secondaires actifs après J4 : 11% à J7, 0% à J14.

Dans la culture n°3, la série A présente 0% de follicules secondaires actifs à J4 par contre à partir de J4 elle est la seule à en avoir : 50% à J7, 36% à J14.

Les meilleurs taux de follicules secondaires actifs de J4 à J14 se retrouvent donc :

- pour la culture n°1 : dans les milieux de la série A (C1SA)
- pour la culture n°2 : dans les milieux de la série D (C2SD)
- pour la culture n°3 : dans les milieux de la série A (C3SA)

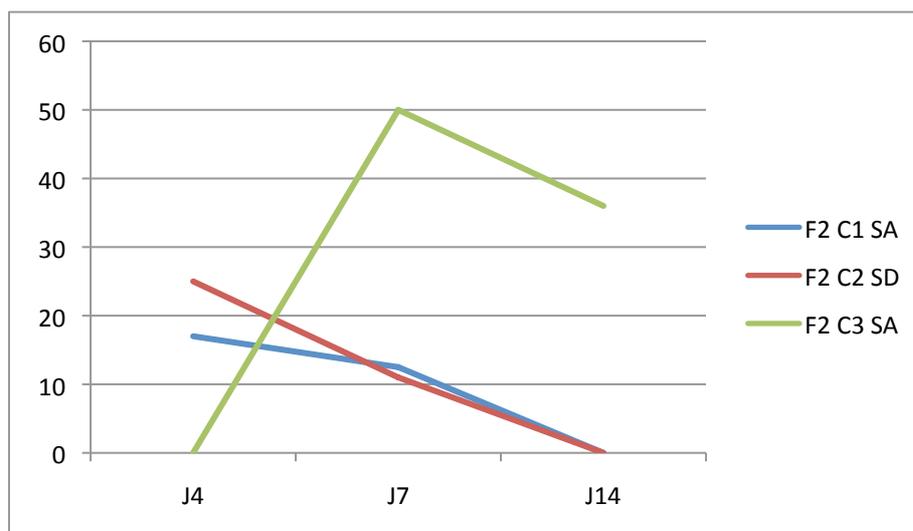


Figure 41. Comparatif des meilleures séries des 3 cultures : C1SA, C2SD, C3SA en fonction du taux de follicules secondaires actifs de J4 à J14.

Si l'on compare maintenant la qualité du stroma de soutien et des cellules de la granulosa des complexes cumulo-ovocytaires dans les 3 cultures, on retrouve un meilleur maintien de l'état de ces deux structures dans la culture n°3 quel que soit le temps de la culture, comme en témoigne les photos. La préservation de la qualité de ces cellules est parfois même indépendante de l'état atrésique de l'ovocyte.

DISCUSSION

Après congélation-décongélation des tissus, le nombre des follicules actifs, aussi bien primordiaux que primaires, était diminué, comparé à ceux de la littérature (Hovatta et al., 1997).

Nous allons commencer par analyser chaque culture puis nous ferons une comparaison des cultures entre elles et une synthèse.

1. CULTURE N° 1

Cette culture utilise un milieu de culture extrêmement simple : le Leibovitz. Ce milieu ne contient pas de facteurs de croissance.

Notre hypothèse a été de supposer que l'adjonction de sérum fœtal humain aux cultures, permettant ainsi l'apport de facteurs de croissance, serait bénéfique.

Cette adjonction a été faite à différentes concentrations : série A 10%, série B 30%, série C 50%. Dans la série A, la mise en croissance est moins rapide que dans les deux autres séries de J0 à J4, mais cette croissance se maintient et est constante jusqu'à J14 autant pour les follicules primaires que secondaires.

La survie est également meilleure que dans les deux autres séries car elle persiste jusqu'à J7 (14% pour les follicules primaires et 12,5% pour les secondaires). Dans les séries B et C, la mise en croissance est légèrement plus rapide à J4 mais la survie est médiocre dès J4 (0%).

Il semble que l'apport important de sérum humain soit toxique pour les follicules (ovocyte + granulosa) et pour le stroma car la survie est mauvaise passé 10% de sérum.

2. CULTURE N° 2

Cette culture contient le milieu de culture actuellement utilisé par les équipes faisant de la recherche sur la culture folliculaire in vitro à partir des fragments de cortex ovariens frais ou cryoconservés : l' α MEM.

Ce milieu contient déjà des facteurs de croissance ; nous y avons également ajouté de la FSH (Roy and Treacy, 1993), de l'activine A (Telfer et al., 2008), de l'insuline (Hovatta et al., 1997) pour promouvoir la croissance et la survie folliculaire comme le conclue Smitz et al en 2010 dans une revue sur la culture folliculaire in vitro (Smitz et al., 2010). Nous avons donc voulu expérimenter les données acquises au cours de la recherche sur la croissance folliculaire in vitro.

Cette culture présente des résultats de faible puissance car les effectifs folliculaires sont peu importants.

On retrouve tout de même une mise en croissance massive dans les séries avec du bpV : séries A et D, avec diminution importante des follicules primordiaux (71% à 0%) et augmentation massive des follicules primaires à J4 (29% à 86-85%). La survie n'est par contre pas bonne dans ces 2 séries et on s'aperçoit que la survie des follicules primaires ou secondaires à J4 est meilleure dans les séries sans bpV.

L'activine A, qui est connue pour son effet activateur sur les follicules antraux, semble dans cette culture être également propice aux stades précoces de la folliculogénèse comme en témoigne les taux de follicules secondaires actifs à J4 de la série B.

La poursuite de la croissance et le maintien de la survie de J4 à J14 sont meilleurs lorsque du cholestérol est ajouté à la culture, comme dans la série D qui présente 11% de follicules secondaires actifs à J7.

3. CULTURE N° 3

Cette culture a été réalisée afin de tester un milieu de culture qui est habituellement utilisé pour une toute autre culture tissulaire. Effectivement l'Amniomax-II est un milieu de culture utilisé essentiellement en cytogénétique et contient déjà des facteurs de croissance nécessaires à la multiplication cellulaire.

Notre hypothèse, quant à l'utilisation de ce milieu de culture, a été de supposer que ce milieu serait favorable à la survie des cellules du tissu conjonctif de soutien des follicules, permettant ainsi une meilleure interaction stroma-ovocyte-granulosa.

Cette culture compare également l'effet du bpV (pic) et de l'ajout de sérum fœtal avec ce type de milieu.

Après 4 jours de culture, les études morphologiques ont montré une diminution sensible des follicules primordiaux (de 67% à J0, à 0% à J4 pour les séries avec bpV et 12% à J4 pour la série A) et une augmentation importante des follicules primaires (de 33% à J0 à 84,5% en moyenne pour les 3 séries à J4) et secondaires (de 0% à J0 à 11,5% en moyenne à J4).

L'apport de bpV semble accélérer la croissance : 12,5% et 16% de follicules secondaires dans les séries B et C vs 6% dans la série A ; mais cette initiation de la croissance, tout comme la survie, ne se maintient pas dans le temps : chute du taux de J4 à J14 dans les séries B et C alors que dans la série A ce taux augmente progressivement.

L'apport de sérum humain dans la série C ne semble pas apporter de bénéfices en terme de poursuite de la croissance après le stade primaire et en terme de

survie. Comme l' α MEM (Hovatta et al., 1999), l'Amniomax-II ne nécessite pas à priori l'adjonction de facteurs de croissance présents dans le sérum humain.

L'effet bénéfique attendu de l'Amniomax-II sur la qualité du stroma et de la granulosa a été effectivement observé durant la culture, et particulièrement dans la série A.

4. COMPARAISON DES CULTURES

Nous avons voulu extraire des résultats de ces cultures, les séries qui nous semblaient les plus intéressantes sur le plan du taux de follicules secondaires actifs de J0 à J4, puis de J4 à J14. Et ainsi essayer de déterminer les milieux de culture les plus propices selon nous à la culture folliculaire in vitro, en fonction du temps, observés lors de notre étude.

L'initiation de la croissance de J0 à J4 avec apparition de follicules secondaires actifs est plus importante dans la série B de la culture n°2 (C2SB). Il s'agit de la série « témoin » de la culture n°2, c'est à dire la série ne comportant ni bpV ni cholestérol.

De J4 à J14 les meilleurs taux de follicules secondaires actifs ne se retrouvent pas dans les mêmes séries que précédemment, à l'exception de la culture n°1.

La survie et le développement des follicules secondaires de J4 à J14 sont plus importants dans la série A de la culture 3 (C3SA), c'est à dire au sein d'une culture sans bpV (pic) et sans sérum foetal humain.

Ainsi contrairement à ce que les résultats de la croissance engendrée par l'apport de bpV (pic) auraient pu laisser croire, lorsque la survie entre en jeu on

s'aperçoit que les séries avec bpV ne sont pas les meilleures ni de J0 à J4, ni de J4 à J14. On retrouve encore ici un effet pro-apoptotique du bpV (pic).

Notre comparaison s'appuie sur le caractère actif ou non des follicules, et donc sur l'état des ovocytes au sein des complexes.

Si maintenant on s'attache à l'état des cellules de la granulosa du complexe et à l'état des cellules du stroma de soutien, on s'aperçoit que les résultats vont dans le même sens. En effet la qualité du stroma et de la granulosa est altérée dans les milieux avec du sérum humain (culture n°1), alors qu'elle est relativement bien conservée dans les milieux avec de l'Amniomax-II (culture n°3).

D'une façon globale, de J0 à J14, il apparaît que les séries de la culture n°3 sont plus propices à la croissance et à la survie folliculaire in vitro comparées aux autres cultures qui présentent des résultats inconstants. La relative meilleure conservation du stroma adjacent et des cellules de la granulosa des follicules dans les cultures avec l'Amniomax-II en témoigne également. L'utilisation de l'Amniomax-II en tant que milieu de culture de base des cultures de cortex ovariens humains cryoconservés apparaît comme étant une alternative intéressante et efficace aux milieux de cultures habituellement utilisés (α MEM, ...).

Au final il semble, aux vues de notre travail, que le système de culture à privilégier est un milieu utilisant un milieu basal enrichi tel que l' α MEM sans sérum humain associé, de l'activine A avec de l'insuline, de J0 à J4 afin d'initier la croissance des follicules et de préserver la survie. Puis à partir de J4 d'instaurer un milieu basal par Amniomax-II pour maintenir le développement et la survie des follicules grâce à son action bénéfique sur le stroma adjacent et la granulosa.

Cependant les conclusions de ce travail nécessitent d'être renforcée par l'étude de cultures dont le milieu de base serait de l'Amniomax-II auquel serait ajouté de l'activine A et de l'insuline dès le début de la culture. En effet ce nouveau milieu de culture serait peut être finalement bénéfique dès le début de la culture de cortex ovariens humains à la place de l' α MEM, lorsque celui ci est associé à de l'activine A et de l'insuline.

5. DISCUSSION GENERALE

Actuellement la cryoconservation du tissu ovarien offre plusieurs avantages concernant la conservation des gamètes femelles en médecine humaine. Avec cette technique il est possible de conserver un très grand nombre de follicules primordiaux qui constitueront la réserve ovarienne.

Nous avons travaillé sur la mise au point d'un milieu de culture permettant la mise en croissance in vitro de ces follicules primordiaux puis la poursuite de la croissance folliculaire in vitro ; tout ceci au sein de fragments de cortex ovarien humain préalablement cryoconservés dans un souci de préservation de la fertilité. Nous nous sommes basés sur les principes de culture recueillis dans la littérature.

Les résultats de ce travail montrent que les follicules primordiaux chez l'homme peuvent être activés in vitro au sein du cortex. Après 4 jours de culture, les études morphologiques ont montré une diminution sensible des follicules primordiaux (de 67% à J0 à 0% à J4) et une augmentation importante des follicules primaires (de 33% à J0 à 88% en moyenne pour les 3 séries à J4) et secondaires (de 0% à J0 à 11,7% en moyenne à J4).

Nous avons donc obtenu, comme Howatta en 1997 (Howatta et al., 1997) et Hreinsson en 2002 (Hreinsson et al., 2002), une initiation massive de la croissance avec passage massif des follicules primordiaux en follicules primaires. Au contraire de la culture d'ovaire entier de souris (Eppig and O'Brien, 1996) où la mise en croissance des follicules primordiaux est beaucoup plus limitée ainsi que *in vivo*, le nombre de follicules primordiaux initiant la croissance est plus limité. Dans les études chez l'animal on attribuerait ce phénomène à l'absence de zone médullaire de l'ovaire et donc à l'absence de facteurs inhibiteurs intra ovariens lors des cultures de tranches de cortex ovarien (Peters et al., 1973)(Wandji et al., 1997).

Comme Howatta en 1999, nos cultures montrent qu'il est possible de mettre en croissance des follicules primordiaux dans des modèles de culture de cortex ovariens sans sérum humain (cultures n° 2 et 3) (Howatta et al., 1999). En effet les milieux de cultures actuellement recommandés, en particulier l' α MEM (Wright et al., 1999), contiennent les facteurs de croissance et nutriments nécessaires. Il semble même dans la culture n°1, que des concentrations trop élevées de sérum humain, deviennent toxiques pour la survie folliculaire et des cellules stromales. Nous n'avons par contre pas obtenu, dans la culture n°2, les mêmes résultats que Howatta en 1999 qui avait retrouvé 38 % de follicules secondaires non atrétiques à J10 dans des cultures sans sérum + α MEM (Howatta et al., 1999). Nous n'obtenons que 11% à J7 dans le bras D et 0% dans les autres bras. Dans nos cultures, ce modèle de culture validé dans la littérature, a entraîné une mise en croissance très faible avec les plus petits effectifs retrouvés durant cette étude.

Par contre les résultats de ces cultures sont en accord avec ceux de Li qui avaient observé le rôle du bpV (pic) dans l'activation des follicules ovariens

dormants chez la femme (Li et al., 2010). En effet nous notons bien une mise en croissance plus massive avec disparition des follicules primordiaux et augmentation des follicules primaires plus rapide que dans les bras sans bpV dans les premières 24 heures. Par contre nous n'avons pas observé de différence dans l'augmentation des follicules secondaires (x 4 chez Li et al.) ; au contraire on note une diminution de la survie et de la poursuite de la croissance dans les bras avec bpV.

Si l'on fait une comparaison des cultures entre elles, en fonction du critère de jugement que nous avons pensé être le plus pertinent à savoir le taux de follicules secondaires actifs, il ressort que le milieu de culture le plus bénéfique pour la croissance folliculaire in vitro initiale (J0 à J4) est le milieu B de la culture n°2 c'est à dire un milieu présentant de l' α MEM, de l'insuline et de l'activine A sans bpV (pic). L'activine A permettrait donc aussi peut être l'initiation de la croissance lorsqu'elle est associée à un milieu enrichi de facteurs de croissance et permettrait de garder les follicules en vie pour leur développement ultérieur.

La survie et la poursuite de la croissance folliculaire à partir de J4 sont par contre meilleures dans le milieu de la culture n°3 contenant de l'Amniomax-II seul, sans bpV (pic).

Ainsi, au final, aucunes des cultures sélectionnées pour être les plus propices au développement folliculaire in vitro ne contient de bpV. On remarque également que les séries contenant le milieu de culture habituellement utilisé pour la culture cellulaire fibroblastique, l'Amniomax, affichent des résultats encourageants de J0 à J4 et sont les meilleures de J4 à J14. Ces résultats, ainsi que l'effet bénéfique de l'Amniomax-II visualisé parallèlement sur le stroma adjacent et la granulosa, nous ont confortés dans l'idée qu'il faut favoriser

l'ensemble de l'interaction ovocyte-granulosa-stroma pour la réussite de la culture des cortex ovariens.

On peut alors être amené à se demander si des cultures réunissant l'Amniomax et l'activine A ne serait pas intéressantes à réaliser à l'avenir.

En revanche même si un grand nombre de follicules primordiaux a été activé pendant les cultures, peu de follicules primaires ont atteint le stade secondaire. Les conditions de culture sont donc suffisamment riches pour induire l'initiation de la croissance, par contre elles ne semblent pas être suffisantes pour le passage au stade secondaire et antral.

Les conditions de culture doivent être améliorées ; les facteurs de croissance et anti-atrétiques actuellement utilisés ne sont pas suffisants pour garantir le passage aux stades suivants et la survie. Nous avons observé une forte augmentation des follicules atrétiques durant les cultures au cours du temps.

Nos résultats sont également issus de cultures de fragments de cortex ovariens humains congelés-décongelés provenant d'une patiente déjà traitée par des traitements cytotoxiques avant sa cryoconservation. La richesse folliculaire des fragments de cortex retrouvée à J0 après décongélation est moins importante que celle décrite dans la littérature et en particulier par Hovatta en 1997 (Hovatta et al., 1997). D'ailleurs les fragments utilisés dans les cultures contemporaines proviennent la plupart de temps de femmes jeunes en bonne santé n'ayant pas reçu de traitements toxiques avant le prélèvement ; de plus les prélèvements sont la plupart du temps utilisés frais. Ceci peut donc expliquer la discordance de nos résultats en termes de d'effectif et de qualité avec ceux de la littérature. Cependant, notre patiente a le profil d'une candidate à la technique de cryoconservation de tissus ovariens.

CONCLUSION

Les résultats de notre étude ont montré qu'il était possible d'initier la croissance folliculaire in vitro au sein de cultures sans sérum. Un apport de cholestérol à partir de J4 semble améliorer la survie mais cette hypothèse nécessite d'être démontrée par des études plus puissantes.

Le meilleur protocole de culture folliculaire in vitro déduit de cette étude est un protocole séquentiel : de J0 à J4 un milieu composé d' α MEM, de FSH, d'insuline et d'activine A ; et de J4 à J14 un milieu fait d'Amniomax-II et de FSH. Ce protocole séquentiel semble répondre aux besoins évolutifs de la croissance folliculaire.

Notre travail a également mis en évidence l'effet « booster » du bpV (pic) sur l'initiation de la croissance en mobilisant le pool de follicules dormants. En effet le passage des follicules du stade primordial au stade primaire est massif dans les cultures ayant bénéficiées de bpV dans les 24 premières heures. Le passage au stade secondaire est également plus important dans les séries avec bpV.

Dans nos travaux, la survie de ces follicules est par contre moins bonne que celle des follicules mis en culture sans bpV. Le bpV semble donc précipiter les follicules activés vers l'atrésie. Ces activateurs de recrutement folliculaire semblent donc intéressants dans l'avenir de la folliculogénèse in vitro afin d'optimiser le recrutement folliculaire des fragments ovariens dont la richesse, dans la réalité comme dans notre étude, peut être très limitée. Par contre l'effet pro-apoptotique retrouvé, de cette initiation massive de la folliculogénèse devra être étudié et corrigé.

En attendant il semble que l'utilisation de l'Amniomax-II pourrait être bénéfique dans les cultures de follicules au sein des cortex ovariens, en stimulant la survie et la croissance des cellules de la granulosa et du stroma ovarien. L'association de ce nouveau milieu de culture aux facteurs de croissance folliculaire déjà connus tels que l'insuline et l'activine A serait intéressante à étudier.

Enfin aux vues du taux d'arrêt de croissance et du taux d'apoptose observés dans les cultures ; nous devons poursuivre les recherches pour une meilleure compréhension des mécanismes d'initiation de la folliculogénèse , du rôle des principaux facteurs de croissance, et des besoins métaboliques des petits follicules en croissance.

ANNEXE

Annexe 1. Accord du Comité d’Ethique du CHU de Limoges de septembre 2010

CHU LIMOGES
Commission Médicale d’Etablissement

Comité d’Ethique

Président : Docteur Gérard TERRIER

Avis 50-2010-08 :

Demande d’avis du Comité d’Ethique pour une étude :

«*La culture folliculaire in vitro*» dont l’investigateur est Madame Laurène DONADEL, interne de spécialité dans le service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital de la Mère et de l’Enfant, CHU de Limoges sous la responsabilité du Docteur P. PIVER, service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital de la Mère et de l’Enfant, CHU de Limoges.

L’objectif de cette recherche est d’obtenir une croissance folliculaire et ovocytaire in vitro complète : du follicule primordial au follicule pré-ovulatoire, à partir de la mise en culture de fragments de cortex ovariens congelés, prélevés chez une femme en âge de procréer.

Pour cette étude, le consentement écrit d’une patiente, hystérectomisée, renonçant à toute grossesse, a été recueilli afin d’utiliser, à des fins de recherches, ses fragments de cortex ovariens une fois congelés.

Il est à noter que la loi française ne permet pas l’utilisation de ces prélèvements après le décès des patientes.

La question posée est la suivante : l’objectif poursuivi est-il conforme à l’éthique ?

Le projet est exposé par Madame Lorène DONADEL et le Docteur P. PIVER qui, après avoir répondu aux questions, se retirent.

Le Comité d’Ethique délibère et rend l’avis suivant à l’unanimité des membres présents :

Le Comité d’Ethique réuni le 16 septembre 2010 n’émet pas de remarque particulière sur l’objectif poursuivi dans l’étude intitulée :

«*La culture folliculaire in vitro*» dont l’investigateur est Madame Laurène DONADEL, interne de spécialité dans le service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital de la Mère et de l’Enfant, CHU de Limoges sous la responsabilité du Docteur P. PIVER, service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital de la Mère et de l’Enfant, CHU de Limoges.

Avis émis en Comité d’Ethique du 16 septembre 2010.

Docteur Gérard TERRIER

Secrétariat : **Caroline TAURON**
 05 55 05 86 14 (poste : 58 614)
 (Service d’accompagnement et de soins palliatifs)

BIBLIOGRAPHIE

Anckaert, E., Adriaenssens, T., Romero, S., Dremier, S., Smitz, J., 2009. Unaltered imprinting establishment of key imprinted genes in mouse oocytes after in vitro follicle culture under variable follicle-stimulating hormone exposure. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 541–548.

Aubard, Y., Newton, H., Oktay, K., Piver, P., Gosden, R., 1996. [Follicle freezing and autografting. A new method of medically assisted procreation?]. *Presse Med* 25, 921–923.

Aubard, Y., Teissier, M.P., Baudet, J.H., 1994. [Cryopreservation of the ovary and ovarian tissue]. *Rev Fr Gynecol Obstet* 89, 192–197.

Carroll, J., Gosden, R.G., 1993. Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum. Reprod.* 8, 1163–1167.

Carroll, J., Whittingham, D.G., Wood, M.J., Telfer, E., Gosden, R.G., 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod. Fertil.* 90, 321–327.

Castrillon, D.H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W., DePinho, R.A., 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301, 215–218.

Chambers, S.K., Chambers, J.T., Holm, C., Peschel, R.E., Schwartz, P.E., 1990. Sequelae of lateral ovarian transposition in unirradiated cervical cancer patients. *Gynecol. Oncol.* 39, 155–159.

Chen, C., 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1, 884–886.

Dolmans, M.-M., Demylle, D., Martinez-Madrid, B., Donnez, J., 2005. Efficacy of in vitro fertilization after chemotherapy. *Fertil. Steril.* 83, 897–901.

Dolmans, M.-M., Marinescu, C., Saussoy, P., Van Langendonck, A., Amorim, C., Donnez, J., 2010. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood* 116, 2908–2914.

Donnez, J., Bassil, S., 1998. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum. Reprod. Update* 4, 248–259.

Eppig, J.J., 1991. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13, 569–574.

Eppig, J.J., O'Brien, M.J., 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol. Reprod.* 54, 197–207.

Eppig, J.J., Pendola, F.L., Wigglesworth, K., Pendola, J.K., 2005. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biol. Reprod.* 73, 351–357.

Familiari, G., Caggiati, A., Nottola, S.A., Ermini, M., Di Benedetto, M.R., Motta, P.M., 1993. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's

- disease. *Hum. Reprod.* 8, 2080–2087.
- Fan, H.-Y., Liu, Z., Cahill, N., Richards, J.S., 2008. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Mol. Endocrinol.* 22, 2128–2140.
- Findlay, J.K., Drummond, A.E., Dyson, M.L., Baillie, A.J., Robertson, D.M., Ethier, J.-F., 2002. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 35–43.
- Gaetani, A., De Simone, M., Urgesi, A., Levis, A., Resegotti, A., Ragona, R., Anglesio, S., 1988. Lateral high abdominal ovariopexy: an original surgical technique for protection of the ovaries during curative radiotherapy for Hodgkin's disease. *J Surg Oncol* 39, 22–28.
- Gosden, R.G., Wade, J.C., Fraser, H.M., Sandow, J., Faddy, M.J., 1997. Impact of congenital or experimental hypogonadotrophism on the radiation sensitivity of the mouse ovary. *Hum. Reprod.* 12, 2483–2488.
- Gougeon, A., 1986. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum. Reprod.* 1, 81–87.
- Hovatta, O., 2005. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online* 10, 729–734.
- Hovatta, O., Silye, R., Abir, R., Krausz, T., Winston, R.M., 1997. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum. Reprod.* 12, 1032–1036.
- Hovatta, O., Wright, C., Krausz, T., Hardy, K., Winston, R.M., 1999. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum. Reprod.* 14, 2519–2524.
- Hreinsson, J.G., Scott, J.E., Rasmussen, C., Swahn, M.L., Hsueh, A.J.W., Hovatta, O., 2002. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 316–321.
- Katayama, T., Shiota, K., Takahashi, M., 1990. Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. *Mol. Cell. Endocrinol.* 69, 179–185.
- Kim, S.S., 2006. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil. Steril.* 85, 1–11.
- Li, J., Kawamura, K., Cheng, Y., Liu, S., Klein, C., Liu, S., Duan, E.-K., Hsueh, A.J.W., 2010. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 10280–10284.
- McGee, E.A., Smith, R., Spears, N., Nachtigal, M.W., Ingraham, H., Hsueh, A.J., 2001. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 64, 293–298.
- Meirow, D., 2000. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol. Cell. Endocrinol.*

169, 123–131.

Menashe, Y., Pearlstone, A.C., Surrey, E.S., 1996. Spontaneous pregnancies despite failed attempts at ovulation induction in a woman with iatrogenic premature ovarian failure. *J Reprod Med* 41, 207–210.

Mizunuma, H., Liu, X., Andoh, K., Abe, Y., Kobayashi, J., Yamada, K., Yokota, H., Ibuki, Y., Hasegawa, Y., 1999. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology* 140, 37–42.

Morita, Y., Perez, G.I., Paris, F., Miranda, S.R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J.C., Schuchman, E.H., Kolesnick, R.N., Tilly, J.L., 2000. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* 6, 1109–1114.

Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., Sharma, V., Gosden, R., 1996. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 11, 1487–1491.

O'Brien, M.J., Pendola, J.K., Eppig, J.J., 2003. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol. Reprod.* 68, 1682–1686.

Oktay, K., Cil, A.P., Bang, H., 2006. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil. Steril.* 86, 70–80.

Oktay, K., Newton, H., Aubard, Y., Salha, O., Gosden, R.G., 1998. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil. Steril.* 69, 1–7.

Oktay, K., Nugent, D., Newton, H., Salha, O., Chatterjee, P., Gosden, R.G., 1997. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 67, 481–486.

Paris, F., Perez, G.I., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., Nguyen, H., Bose, M., Ilagan, A., Hunt, P.A., Morgan, W.F., Tilly, J.L., Kolesnick, R., 2002. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat. Med.* 8, 901–902.

Peters, H., Byskov, A.G., Lintern-Moore, S., Faber, M., 1973. Proceedings: Follicle growth initiation in the immature mouse ovary: extraovarian or intraovarian control? *J. Reprod. Fertil.* 35, 619–620.

Picton, H.M., Harris, S.E., Muruvi, W., Chambers, E.L., 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction* 136, 703–715.

Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hämäläinen, T., Peng, S.L., Lan, Z.-J., Cooney, A.J., Huhtaniemi, I., Liu, K., 2008a. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319, 611–613.

Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hämäläinen, T., Peng, S.L., Lan, Z.-J., Cooney, A.J., Huhtaniemi, I., Liu, K., 2008b. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319, 611–613.

Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E., Colamaria, S., Sapienza, F., Ubaldi, F., 2010. Embryo development of fresh “versus” vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum. Reprod.* 25, 66–73.

Roy, S.K., Treacy, B.J., 1993. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil. Steril.* 59, 783–790.

Salooja, N., Chatterjee, R., McMillan, A.K., Kelsey, S.M., Newland, A.C., Milligan, D.W., Franklin, I.M., Hutchinson, R.M., Linch, D.C., Goldstone, A.H., 1994. Successful pregnancies in women following single autotransplant for acute myeloid leukemia with a chemotherapy ablation protocol. *Bone Marrow Transplant.* 13, 431–435.

Sasseville, M., 2007. Le rôle des phosphodiesterases dans le follicule ovarien. Thèse de doctorat en sciences animales. Université de Laval.

Scott, J.E., Carlsson, I.B., Bavister, B.D., Hovatta, O., 2004. Human ovarian tissue cultures: extracellular matrix composition, coating density and tissue dimensions. *Reprod. Biomed. Online* 9, 287–293.

Silva, J.R.V., Tharasanit, T., Taverne, M.A.M., van der Weijden, G.C., Santos, R.R., Figueiredo, J.R., van den Hurk, R., 2006. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J. Endocrinol.* 189, 113–125.

Smitz, J., Dolmans, M.M., Donnez, J., Fortune, J.E., Hovatta, O., Jewgenow, K., Picton, H.M., Plancha, C., Shea, L.D., Stouffer, R.L., Telfer, E.E., Woodruff, T.K., Zelinski, M.B., 2010. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum. Reprod. Update* 16, 395–414.

Spears, N., 1994. In-vitro growth of oocytes. *In-vitro growth of ovarian oocytes.* *Hum. Reprod.* 9, 969–970.

Telfer, E.E., McLaughlin, M., 2007. Natural history of the mammalian oocyte. *Reprod. Biomed. Online* 15, 288–295.

Telfer, E.E., McLaughlin, M., Ding, C., Thong, K.J., 2008. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* 23, 1151–1158.

Thomas, F.H., Armstrong, D.G., Telfer, E.E., 2003. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 76.

Trounson, A., Mohr, L., 1983. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305, 707–709.

Tucker, M.J., Morton, P.C., Wright, G., Sweitzer, C.L., Massey, J.B., 1998. Clinical application of human egg cryopreservation. *Hum. Reprod.* 13, 3156–3159.

Wallace, W.H.B., Thomson, A.B., Saran, F., Kelsey, T.W., 2005. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62, 738–744.

Wandji, S.A., Srsen, V., Nathanielsz, P.W., Eppig, J.J., Fortune, J.E., 1997. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Hum. Reprod.* 12, 1993–2001.

West, E.R., Shea, L.D., Woodruff, T.K., 2007. Engineering the follicle microenvironment. *Semin. Reprod. Med.* 25, 287–299.

Wright, C.S., Hovatta, O., Margara, R., Trew, G., Winston, R.M., Franks, S., Hardy, K., 1999. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Hum. Reprod.* 14, 1555–1562.

TABLE DES MATIERES

<i>Remerciements</i>	8
<i>Liste des abbréviations</i>	13
<i>PRESERVATION DE LA FERTILITE – ETAT DES CONNAISSANCES</i>	17
<i>1. Indications de la préservation de la fertilité</i>	17
1.1 LES CANCERS	17
1.1.1 Les chimiothérapies.....	18
1.1.2 La radiothérapie	20
1.1.3 La chirurgie.....	21
1.1.4 La préparation pré-greffe	22
1.1.5 Conclusion	23
1.2 LES AUTRES CAUSES D’INSUFFISANCE OVARIENNE PREMATUREE	24
1.2.1 Ovariectomie bilatérale.....	24
1.2.2 Maladies auto immunes.....	25
1.2.3 Maladies génétiques	25
<i>2. Les techniques de préservation de la fertilité</i>	26
2.1 LA TRANSPOSITION OVARIENNE	27
2.2 LES METHODES PHARMACOLOGIQUES.....	27
2.2.1 Les agonistes du GnRH : « la suppression ovarienne ».....	28
2.2.2 La contraception orale.....	28
2.2.3 Les inhibiteurs d’apoptose.....	28
2.2.4 L’acétate de médroxyprogestérone.....	29
2.3 LES METHODES MEDICALES D’ASSISTANCE A LA PRESERVATION DE LA FERTILITE	30
2.3.1 La cryopréservation embryonnaire.....	31
2.3.2 La cryopréservation ovocytaire	32
2.3.3 La cryoconservation tissulaire	35
<i>3. La culture folliculaire in vitro : croissance et maturation folliculaire in vitro</i>	45
3.1 MODELE MURIN : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	46
3.2 MODELE HUMAIN : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	47
3.2.1 La folliculogénèse humaine	47
3.2.2 Modèles de culture actuels.....	61
<i>4. Objectifs de notre travail : essai de mise au point d’un modèle de culture folliculaire in vitro</i>	63
4.1 CHOIX DE L’ORIGINE DES CORTEX	64
4.2 CHOIX DE LA CULTURE AU SEIN DU CORTEX : ARCHITECTURE 3D VERSUS 2D	65
4.3 CHOIX DE TISSUS OVARIENS CONGELES OU FRAIS.....	66
4.4 CHOIX DES MILIEUX DE CULTURE	67
4.4.1 Milieu avec ou sans sérum humain	67

4.4.2 Apport de bpV (pic).....	68
4.4.3 Apport d'activine A.....	69
4.4.4 Choix du milieu de culture basal.....	70
<i>MATERIEL et METHODES</i>	71
1. <i>PATIENTE</i>	71
2. <i>CULTURES TISSULAIRES</i>	71
2.1 CULTURE N° 1	72
2.2 CULTURE N° 2	73
2.3 CULTURE N° 3	74
2.4 OBTENTION DE SERUM DE SANG FŒTAL HUMAIN	76
2.5 OUTILS DE MESURE.....	76
2.6 METHODE D'ANALYSE	76
<i>RESULTATS</i>	79
1. <i>Culture n°1</i>	79
2. <i>Culture n°2</i>	87
3. <i>Culture n°3</i>	94
4. <i>Comparaison des résultats</i>	102
<i>DISCUSSION</i>	105
1. <i>CULTURE n° 1</i>	105
2. <i>CULTURE n° 2</i>	106
3. <i>CULTURE n° 3</i>	107
4. <i>COMPARAISON des cultures</i>	108
5. <i>DISCUSSION générale</i>	110
<i>CONCLUSION</i>	114
<i>Annexes</i>	116
<i>Bibliographie</i>	117
<i>Table des matières</i>	122

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maitres 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 maitre, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

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

