
Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

Promoteur : Professeur J.M. Foidart
Co-Promoteur : Docteur S. Labied

**Restauration de la fertilité des
patientes cancéreuses par
cryopréservation de tissu ovarien**



Laurie HENRY

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

- Année Académique 2015-2016 -

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

Promoteur : Professeur J.M. Foidart
Co-Promoteur : Docteur S. Labied

**Restauration de la fertilité des
patientes cancéreuses par
cryopréservation de tissu ovarien**



Laurie HENRY

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques**

- Année Académique 2015-2016 -

La cryopréservation ovarienne est une méthode de préservation de la fertilité parmi d'autres, telle que la vitrification ovocytaire ou embryonnaire. Elle est, par contre, la seule option possible chez les enfants, les jeunes femmes pré-pubères ou lorsque l'on n'a pas le temps de réaliser une stimulation ovarienne. Cette technique, bien qu'encore jeune, est déjà pratiquée dans de très nombreux centres et a permis la naissance d'une soixantaine d'enfants. Néanmoins, une perte folliculaire massive est observée lors de ce processus, grevant la qualité et la durée de vie du greffon. Les études sont particulièrement nombreuses afin d'améliorer cette technique et de pouvoir offrir une méthode sûre et efficace aux patientes à risque de développer une insuffisance ovarienne prématurée.

Nos travaux se sont concentrés sur deux axes principaux de la cryopréservation de tissu ovarien. D'une part limiter la perte folliculaire par apoptose observée lors du processus de congélation et d'autre part réduire la période d'hypoxie tissulaire subie par le greffon les premiers jours suivant la transplantation. L'utilisation du VEGF, un facteur angiogénique très puissant, dans une matrice de collagène enrobant le greffon, nous a permis de stimuler la reperfusion du transplant lors d'une xéno greffe chez la souris. Lors de nos recherches, nous avons constaté à quel point l'hétérogénéité folliculaire au sein du transplant pouvait rendre aléatoire l'analyse de la quantification folliculaire. Nous avons donc mis au point un modèle mathématique nous permettant de palier à cette hétérogénéité et de rendre fiable nos résultats. Dans notre souhait d'améliorer les modèles de xénotransplantation, nous avons également comparé deux souches de souris immunodéprimées, et mis en évidence que les souris SCID semblent être plus adéquates que les souris NOD-SCID pour recevoir le greffon. Nos recherches ont également porté sur l'étude des effets de deux anti-apoptotiques, le Z-VAD-FMK et le S1P, sur la préservation folliculaire lors du processus de préparation et de congélation des fragments. Ceux-ci permettent une meilleure préservation du nombre, de la morphologie et de la prolifération folliculaire, avec un effet plus marqué pour le Z-VAD-FMK, lorsque les fragments sont mis en culture après la décongélation. Ces travaux préliminaires sont encourageants pour de futures études *in vivo*.

En conclusion, nos travaux contribuent à l'amélioration de la cryopréservation ovarienne, que cela soit en développant les modèles utilisés en recherche mais également en améliorant la qualité tissulaire, tant après la congélation qu'après la transplantation. Ils ouvrent également la voie à d'autres recherches *in vivo*, notamment l'étude de la combinaison de facteurs pro-angiogènes avec des agents anti-apoptotiques.

Ce manuscrit résume mes six années de recherches de doctorat et en représente leur accomplissement. Ce travail de recherche, colossal pour l'assistante en Gynécologie que je suis et qui n'avait aucune expérience du laboratoire, n'a été possible que grâce aux multiples personnes qui m'ont entourées et soutenues dans ce projet. C'est elles que je souhaite remercier dans ces quelques lignes.

Tout d'abord, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté la relecture de ce manuscrit, et tout particulièrement le Professeur Demeestere et le Docteur Torre qui ont accepté de faire le déplacement afin de juger le travail de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Foidart, qui m'a accueillie non seulement dans son département clinique mais également dans son laboratoire en m'offrant l'opportunité de réaliser ce Doctorat. Monsieur le Professeur, je vous remercie de m'avoir initiée au goût de la recherche mais également d'avoir continué à suivre mon travail en tant que promoteur, et ce malgré vos nombreuses obligations.

Je remercie le Professeur Nisolle, impliquée depuis les prémices de ce projet et qui n'a eu de cesse de le soutenir jusqu'à cet aboutissement. Je souhaite vous remercier également, Chère Madame le Professeur, pour votre soutien, en tant que chef de Service de Gynécologie au CHR de la Citadelle, dans ma pratique clinique et mon désir de poursuivre ma carrière dans le domaine de la Procréation Médicalement Assistée au sein de votre service.

Je tiens à remercier le Professeur Noël pour son accueil mais également pour ses commentaires constructifs et surtout sa gentillesse lors de ces années passées au sein de son laboratoire.

Qu'aurait été ce travail sans le Docteur Soraya Labied, ma co-promotrice, collègue et bien plus que cela, qui est à l'origine de la recherche sur la cryopréservation ovarienne à l'Université de Liège. Tu as été un pilier infaillible au cours de mes recherches, malgré ton départ du laboratoire en cours de mon doctorat. Lors de ce départ, c'est le Docteur Carine Munaut qui a repris la gestion « au quotidien » de mes recherches et qui a répondu à mes centaines de questions. Que dire de Maïté Fransolet, mon binôme de laboratoire. En effet, nous avons débuté ensemble ce projet et mener mon doctorat « à mi-temps » n'aurait jamais été possible sans ton travail de recherche « à temps plein », ton soutien et ton amitié. C'est pourquoi je tiens à vous remercier toutes les trois, Soraya, Carine et Maïté, pour votre aide au quotidien, votre façon infaillible de me remonter le moral dans mes instants de doutes et surtout pour votre patience face à mes « faiblesses » de clinicienne en travail de

laboratoire.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux, permettant au médecin que je suis de s'intégrer dans leur équipe, même si je ne savais pas ce que représentait une immunohistochimie ni même manier une pipette lors de mon arrivée au laboratoire. Merci pour votre aide au quotidien et votre bonne humeur, qui ont rendu mon temps au laboratoire particulièrement gai et enrichissant. Merci tout particulièrement aux « filles d'histo » et surtout à Isabelle pour son courage à couper mes milliers de lames. Merci à Marie et Fabrice, pour leur aide dans les manipulations de souris. Merci également au Docteur Silvia Blacher, notre spécialiste en analyse d'images digitales, pour ses quantifications de vaisseaux et de cellules en prolifération mais également pour sa bonne humeur et ses airs de tango entraînants.

Je tiens à remercier ma sœur, Noémie, qui m'a toujours soutenue dans mes projets et dans ce doctorat et qui a accepté de relire ce manuscrit, travail au combien rébarbatif pour une personne qui a toujours détesté la Science ! Merci à mes parents, sans lesquels je ne serais pas là aujourd'hui, merci pour votre soutien, votre éducation et votre amour. Merci également à mes beaux-parents pour leur aide au quotidien.

Merci à ma Mamy, qui m'a toujours écoutée, soutenue et épaulée. Tu as été une compagne infaillible lors de mes blocus, toi qui faisais tout ton possible pour m'aider et qui as toujours été si fière de moi. Merci pour tout ma Mamy, toi qui resteras toujours dans mon cœur, qui es partie trop tôt et trop vite, à quelques mois seulement de me voir enfin finir mes études.

Je ne saurais finir ces remerciements sans m'adresser à Jérôme, ma moitié. Je te remercie pour ton amour et ton soutien sans faille, quelques soient mes décisions mais également pour m'avoir donné notre fille, Emma. Merci à tous les deux d'avoir supporté mes doutes, mes études à rallonge et toutes ces heures passées à travailler mais surtout merci pour tout le bonheur que vous m'apportez au quotidien.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du Fonds National de la Recherche Scientifique (via un Grant Télévie) ainsi que du Fonds Léon Fredericq.

ADN : acide désoxyribonucléique	hCG : hormone chorionique gonadotrope
AIF : <i>apoptosis-inducing factor</i>	HIF : <i>hypoxia inducible factors</i>
AMH : <i>anti-müllerian hormone</i>	HMG : <i>human menopausal gonadotropin</i> ou ménotropine
AMP : aide médicale à la procréation	
ANG : angiopoïétine	
Apaf-1 : <i>apoptotic protease-activating factor 1</i>	IAP : <i>inhibitors of apoptosis family</i>
	ICAD : <i>inhibitor of caspase activated DNase</i>
Bcl-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i>	IFN : interféron
BMP15 : <i>bone morphogenetic protein 15</i>	IGF : <i>insulin-like growth factor</i> ou somatomédine C
BPES : <i>Blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome</i>	IL : interleukine
	IOP : insuffisance ovarienne prématurée
CAD : <i>caspase activated DNase</i>	
CAM : <i>chorioallantoic membrane</i> ou membrane chorio-allantoïdienne	LH : luteinizing <i>hormone</i>
dATP : désoxyadénosine triphosphate	MEC : matrice extra-cellulaire
DISC : <i>death-inducing signaling complex</i>	Min : minutes
DMSO : diméthylsulfoxyde	MIV : maturation <i>in vitro</i>
	MMP : métalloprotéases matricielles
EG : éthylène glycol	NK : <i>natural killer</i>
EPR : résonance paramagnétique électronique	NOBOX : <i>newborn ovary homeobox-encoding gene</i>
	NOD : non-obèse diabétique
FADD : <i>FAS-associated protein with death domain</i>	NRARP : <i>NOTCH-regulated ankyrin repeat protein</i>
FAS : <i>apoptosis stimulating fragment</i>	NRP : neuropilines
FGF : <i>fibroblast growth factor</i>	
FITC : <i>fluorescein isothiocyanate</i>	PAI : <i>plasminogen activator inhibitor</i>
FIV : fécondation <i>in vitro</i>	PDGF : <i>Platelet-derived growth factor</i>
FMR : <i>Fragility Mental Retardation</i>	PGF2 : prostaglandine F2
FOXL2 : <i>Forkhead Box L2</i>	PIGF : <i>placental growth factor</i>
FOXO3a : <i>Forkhead Box O3a</i>	PLGA : <i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>
FSH : <i>follicle stimulating hormone</i>	PM : poids moléculaire
	PROH : propylène glycol
GCSF : <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>	PRP : <i>platelet-rich plasma</i>
GDF9 : <i>growth differentiation factor-9</i>	
GnRH : <i>gonadotropin releasing hormone</i>	RT-PCR : <i>reverse-transcribed polymerase chain reaction</i>
GP : globule polaire	

Liste des abréviations

S1P : sphingosine-1-phosphate

SCID : *Severe Combined Immunodeficiency*

SMA : *smooth muscle actin*

Smac/DIABLO : *Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-Binding protein with Low PI*

sVEGFR : récepteur soluble du VEGF

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VEGFR : récepteur du VEGF

Z-VAD-FMK : benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ket

TBI : *total body irradiation*

TGF : *transforming growth factor*

THS : traitement hormonal substitutif

TIMP : *tissue metalloproteinase inhibitor*

TNF : *tumor-necrosis-factor*

TRAIL : *TNF related apoptosis inducing ligand*

Table des matières

Remerciements	v
Liste des abréviations	vii
Introduction	1
1. La reproduction féminine	3
1.1. Embryogenèse ovarienne	3
1.2. Gamétogenèse	4
1.3. Folliculogenèse au cours du cycle menstruel	5
1.4. Evolution de la réserve ovarienne avec l'âge	8
2. L'insuffisance ovarienne prématurée	9
2.1. Définition	9
2.2. Epidémiologie	10
2.3. Etiologies	10
2.4. Complications	13
2.5. Prise en charge	13
2.5.1. Traitement hormonal substitutif	13
2.5.2. Prise en charge de l'infertilité	14
2.5.2.1. Préservation de la fertilité	14
2.5.2.2. Traitement de l'infertilité	17
3. La cryopréservation et l'autogreffe de tissu ovarien	18
3.1. Définition	18
3.2. Indications	18
3.3. Historique et état de l'art	20
3.4. Technique	21
3.4.1. Prélèvement	21
3.4.2. Transport et préparation	22
3.4.3. Congélation	24
3.4.3.1. Bases de la cryobiologie	24
3.4.3.2. En pratique	27
3.4.4. Décongélation	29
3.4.5. Greffe	29
3.5. Limitations de la cryopréservation ovarienne	31
3.5.1. Hypoxie tissulaire	31

3.5.1.1. Hypoxie et lésions tissulaires lors de la transplantation	31
3.5.1.2. Angiogenèse	32
3.5.1.2.1. Généralités	32
3.5.1.2.2. Ovaire et angiogenèse	34
3.5.1.2.3. VEGF	36
3.5.2. Perte folliculaire par apoptose	40
3.5.2.1. Apoptose liée à la cryopréservation et à la transplantation	40
3.5.2.2. Apoptose	41
3.5.2.2.1. Généralités	41
3.5.2.2.2. Apoptose au niveau ovarien	44
3.5.3. Activation folliculaire	44
3.5.4. Durée de vie fonctionnelle du greffon	45
3.6. Risques de la cryopréservation ovarienne	46
3.7. Modèles expérimentaux	48
3.7.1. Evaluation de la qualité tissulaire après cryopréservation	48
3.7.2. Modèles animaux	49
3.7.2.1. Généralités	49
3.7.2.2. Modèle ovin : comparaison femme-brebis	50
3.7.2.2.1. Anatomie et histologie	50
3.7.2.2.2. Cycles d'activité ovarienne	51
Buts et plan du travail	55
Résultats	59
1. Stimulation de l'angiogenèse et lutte contre l'hypoxie tissulaire post-transplantation	61
1.1. Introduction	61
1.2. Résumé des résultats	62
1.3. Discussion	63
2. Amélioration des techniques de xéno greffe et d'analyse des résultats....	83
2.1. Amélioration de notre méthodologie de quantification folliculaire	83
2.1.1. Introduction	83
2.1.2. Résumé des résultats	83
2.1.3. Discussion	84
2.2. Détermination de la souche de souris idéale en xénotransplantation	93
2.2.1. Introduction	93
2.2.2. Résumé des résultats	93

2.2.3. Discussion.....	94
3. Réduction de l'apoptose liée à la cryopréservation	104
3.1. Introduction.....	104
3.2. Addition d'anti-apoptotiques lors du processus de cryopréservation	105
3.2.1. Résumé des résultats	105
3.2.2. Discussion.....	106
3.3. Etude d'un anti-apoptotique sur des lignées de cellules de la granulosa	117
3.3.1. Résumé des résultats	117
3.3.2. Discussion.....	117
Discussion	129
Perspectives	141
Conclusions	145
Annexes	149
Annexe 1	151
Annexe 2	157
Bibliographie	159
