

Introduction

1. La reproduction féminine

1.1. Embryogenèse ovarienne

Chez les mammifères, tant féminins que masculins, les cellules germinales primordiales prennent naissance au sein de l'ectoderme de l'embryon au cours de la 2^{ème} semaine de développement. Par la suite, elles se déplacent grâce à des mouvements amiboïdes au niveau de l'endoderme de la vésicule vitelline (Figure 1A). Au cours des semaines 4 à 6, ces cellules migrent à nouveau vers la paroi postérieure de l'embryon en passant au niveau de la paroi du tube digestif puis au travers du mésentère, tout en se multipliant par mitose. Elles se placent alors dans le tissu mésenchymateux de part et d'autre de la ligne médiane où elles vont coloniser la région située au niveau de la 10^{ème} vertèbre dorsale où se formeront les gonades (Figure 1B). Les cellules germinales primordiales y stimulent la prolifération de l'épithélium cœlomique adjacent ainsi que du mésonephros qui vont alors former les cordons sexuels primitifs. Ceux-ci induisent la formation des crêtes génitales, un gonflement situé médialement au mésonephros, et ce de chaque côté de la colonne vertébrale. Par la suite, les cordons sexuels primitifs dégèrent alors que le mésothélium de la crête génitale forme la corticale des cordons sexuels secondaires. Ceux-ci envahissent les cellules germinales primordiales et se différencient en cellules folliculaires. Les cellules folliculaires et germinales sont nécessaires à leur bon développement mutuel (Larsen 2003).

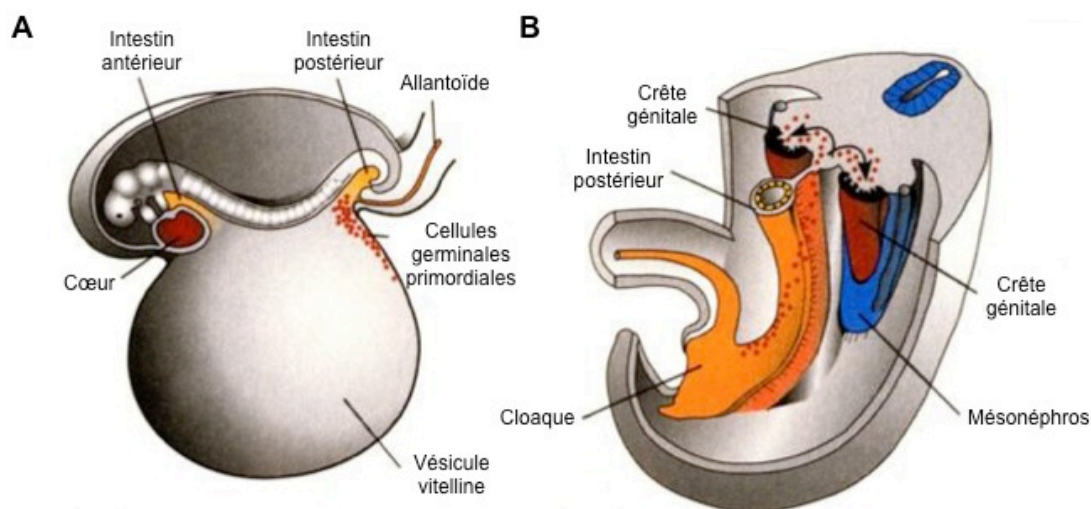


Figure 1 Migration des cellules germinales primordiales. **A** Migration des cellules germinales primordiales dans l'endoderme de la vésicule vitelline. **B** Reprise de la migration via la paroi du tube digestif puis le mésentère jusqu'au niveau du tissu mésenchymateux où se développeront les crêtes génitales. Adapté d'après <http://www.studyblue.com/notes/n/reproductive-physiology/deck/6526125>.

A ce stade, les cellules germinales vont encore se multiplier par mitose avant de se différencier en ovogonies et d'entrer dans leur 1^{ère} division méiotique.

1.2. Gamétogenèse

La gamétogenèse est le processus par lequel les cellules germinales primordiales vont se transformer en ovocytes matures. Une fois réalisée l'évolution des cellules germinales en ovogonies au sein des cordons sexuels secondaires, celles-ci vont débiter leur 1^{ère} méiose et ce, dès le 5^{ème} mois de la vie fœtale. A ce stade, le nombre d'ovogonies a atteint son nombre maximal. La première méiose débute par la réplication de l'ADN, l'ovogonie à 2N (N = le nombre de copie (chromatide) de chaque brin d'ADN) devient l'ovocyte primaire à 4N. Après cette étape, l'ovocyte primaire débute la prophase et entre alors en repos ; son noyau volumineux prend le nom de vésicule germinale.

Cet état quiescent persiste jusqu'à la puberté où, lors de chaque cycle menstruel, certains ovocytes vont reprendre leur cycle méiotique sous l'influence des gonadotrophines hypothalamiques : la FSH (*follicle stimulating hormone*) et la LH (*luteinizing hormone*). Cette reprise de la méiose a lieu au moment des pics de sécrétion des gonadotrophines à l'origine de l'ovulation, elle se termine avec l'expulsion du 1^{er} globule polaire (GP), comportant un chromosome de chaque paire composé de 2 chromatides.

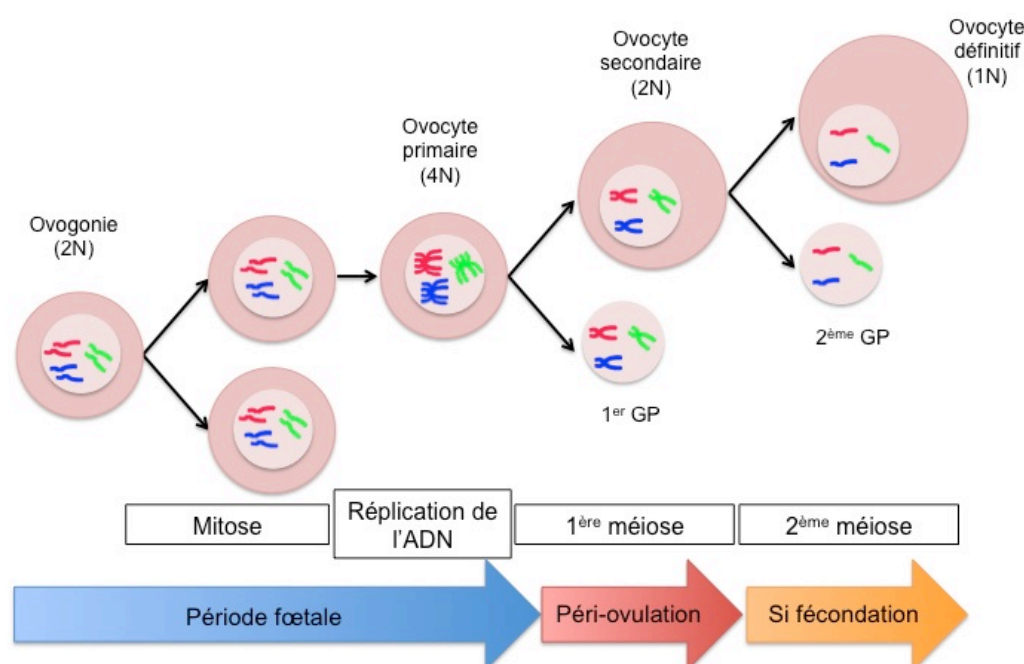


Figure 2 L'ovogenèse. Evolution de l'ovogonie (diploïde 2N) en ovocyte primaire (diploïde 4N), secondaire (haploïde 2N) puis définitif (haploïde 1N) par 2 méioses successives avec l'expulsion de 2 globules polaires.

La seconde méiose débute alors immédiatement puis s'arrête de nouveau et ne s'achèvera qu'en cas de fécondation, lors de la fusion de la membrane cytoplasmique avec celle du spermatozoïde. C'est à ce stade qu'est expulsé le second GP et l'ovocyte qui est alors considéré comme définitif, ne contient plus qu'un seul chromosome à une chromatide de chaque paire (1N) (Figure 2) (Larsen 2003).

1.3. Folliculogénèse au cours du cycle menstruel

La folliculogénèse est un processus complexe qui débute lors de la période embryonnaire et se termine lors d'un cycle menstruel. L'ovocyte primaire doit évoluer et passer par différents stades avant de devenir l'ovocyte ovulé prêt à être fécondé (Figure 3).

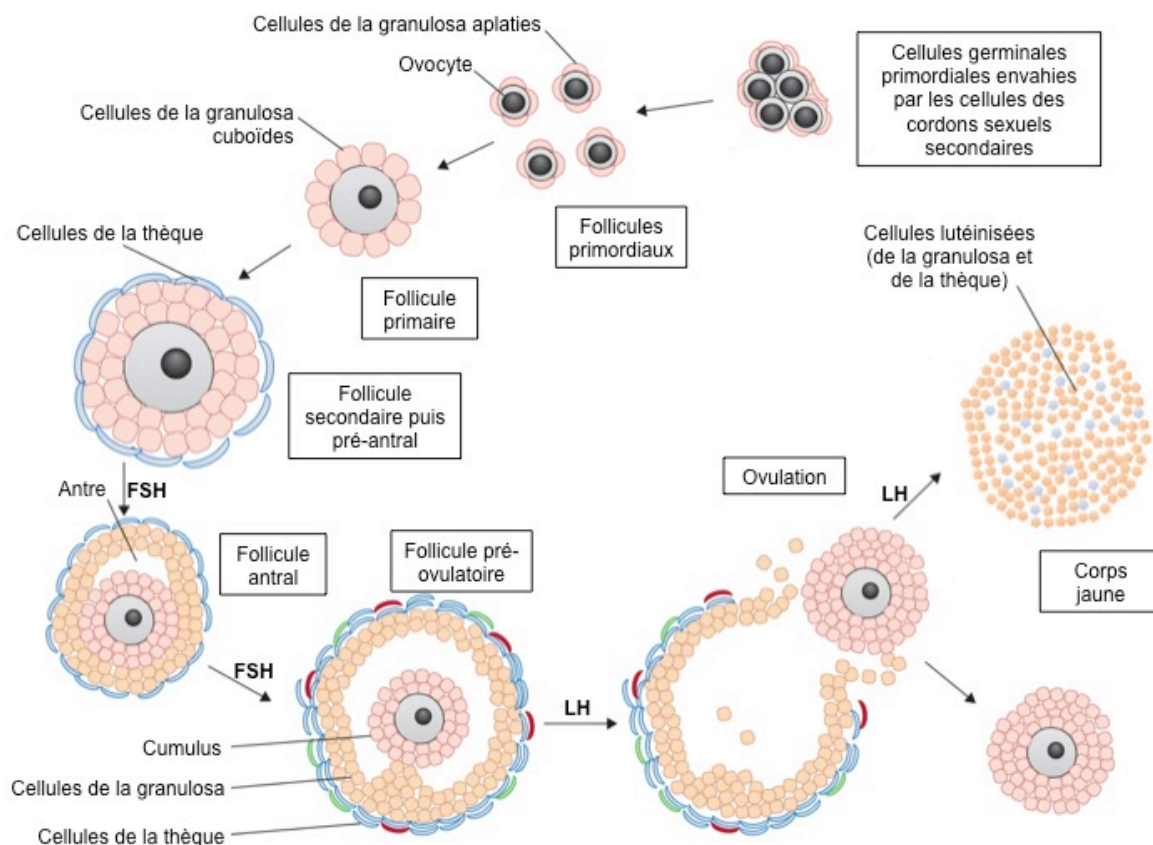


Figure 3 La folliculogénèse. La folliculogénèse débute par le follicule primordial qui est recruté pour devenir primaire. Les cellules de la granulosa prolifèrent et forment plusieurs couches (follicule secondaire puis pré-antral). A ce stade, les cellules de la thèque entourent le follicule, produisent des androgènes qui seront convertis en œstrogènes par les cellules de la granulosa. A partir de cette étape, l'évolution vers le stade pré-ovulatoire devient dépendante des gonadotrophines, en particulier de la FSH. L'antre se forme et sépare les cellules de la granulosa du cumulus entourant l'ovocyte. Après l'ovulation, induite par les pics de sécrétion de LH et FSH, les cellules de la granulosa et de la thèque sont lutéinisées pour former le corps jaune et prêtes à produire de la progestérone. Adapté d'après *Georges et al., J Mol Endocrinol, 2014.*

Chaque ovocyte primaire s'entoure d'une couche de cellules provenant des cordons sexuels secondaires. Il s'agit de cellules épithéliales aplaties nommées cellules folliculaires. L'ensemble de l'ovocyte primaire et de cette couche de cellules folliculaires forme le follicule primordial, d'un diamètre de $\pm 35 \mu\text{m}$.

Dès la puberté, à chaque nouveau cycle menstruel, 5 à 12 follicules par ovaire reprennent leur développement indépendamment des gonadotrophines. Les mécanismes à l'origine de ce recrutement folliculaire sont toujours actuellement mal définis mais plusieurs acteurs moléculaires ont cependant été identifiés (tels que GDF9 (*growth differentiation factor-9*), BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*), FOXL2 (*Forkhead Box L2*), connexine 37,...). Les cellules folliculaires aplaties s'épaississent et deviennent cuboïdes, les follicules prennent alors le nom de primaire et mesurent $45 \mu\text{m}$ de diamètre. Une fine couche de glycoprotéine est sécrétée et se dépose à la surface de l'ovocyte pour former la zone pellucide. Celle-ci est traversée par de fines expansions des cellules folliculaires, les pseudopodes, qui gardent contact avec l'ovocyte. Ces quelques follicules entrent ensuite en voie d'accroissement, les cellules folliculaires (nommées dès lors cellules de la granulosa) prolifèrent alors pour former plusieurs couches et les follicules deviennent secondaires (diamètre de $50 \mu\text{m}$) puis pré-antraux (à partir d'un diamètre de $150 \mu\text{m}$). Dès ces stades précoces, les cellules folliculaires sécrètent des œstrogènes. Certains follicules poursuivent leur maturation alors que d'autres évoluent vers l'atrésie. Au cours de cette évolution, grâce à une activité de biosynthèse, le cytoplasme de l'ovocyte devient plus volumineux. Il faut environ 120 jours pour que le follicule primordial évolue en follicule pré-antral (Figure 4) (Suh 2002, Larsen 2003, Letombe 2012, Georges 2014).

A partir de 6 à 7 couches de cellules folliculaires, une cavité centrale se forme, l'antra, dans lequel va confluer et s'accumuler le fluide folliculaire, liquide extracellulaire riche en eau et en acide hyaluronique sécrété par les cellules de la granulosa. Celles-ci continuent quant à elles à proliférer et à grossir. Le follicule est qualifié d'antral lorsque son diamètre atteint $0,2 \text{ mm}$. De façon conjointe, le stroma ovarien entourant le follicule se différencie en 2 couches largement vascularisées, les thèques interne et externe, séparées de la granulosa par une membrane basale. La thèque interne, située en profondeur et en contact avec le follicule, contient des cellules stéroïdogènes alors que la thèque externe, localisée en périphérie, est composée d'un tissu fibrocellulaire qui protège le follicule du reste du stroma ovarien. Dès ce passage du stade pré-antral au stade antral, la maturation folliculaire devient dépendante des gonadotrophines pituitaires, les cellules de la thèque interne étant sensibles à la LH et les cellules de la granulosa étant sensibles à la FSH. Par la suite, les cellules de la granulosa deviendront également sensibles à la LH. Le recrutement du

follicule antral devient alors cyclique et débute au 1^{er} jour du cycle, lors d'une élévation transitoire du taux de FSH (Figure 4) (Suh 2002, Larsen 2003, Letombe 2012). Les cellules de la thèque interne sont à l'origine de la production d'androgènes sous l'influence de la LH. La FSH est à l'origine de la conversion de ces androgènes en œstradiol, en stimulant l'activité enzymatique de l'aromatase dans les cellules de la granulosa. L'œstradiol et l'IGF-1 (*insuline growth factor 1*), un facteur de croissance dont la production est également stimulée par la FSH, sont à l'origine de la prolifération des cellules de la granulosa. Le nombre de récepteurs à la FSH à la surface des cellules folliculaires augmente progressivement, ce qui a comme conséquence d'augmenter la sensibilité des follicules à cette gonadotrophine. Les cellules de la granulosa sécrètent également de l'inhibine qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypophysaire de FSH ayant pour conséquence une diminution du taux plasmatique (Braham 2009).

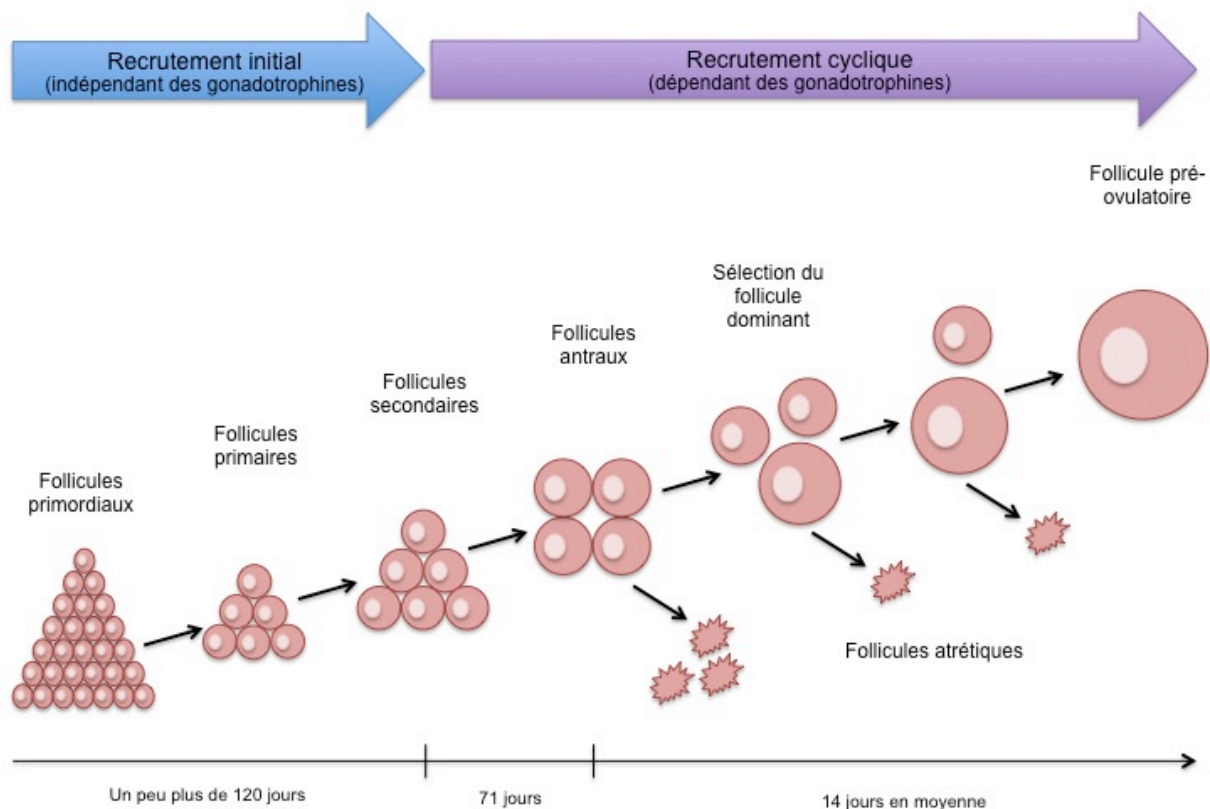


Figure 4 Recrutement folliculaire et durée du processus de sélection. Adapté d'après *Endocrinologie en gynécologie et obstétrique*, Letombe et al., Edition Elsevier Masson, 2012.

Un seul follicule poursuit son développement et devient prédominant alors que les autres dégèrent. Le follicule sélectionné est celui ayant la plus grande affinité à la FSH grâce à un plus grand nombre de récepteurs qui lui permettent de rester sensible même à un taux plasmatique faible de cette gonadotrophine. Les cellules de la granulosa poursuivent leur prolifération, l'antra se développe en se remplissant de fluide folliculaire et

occupe la majeure partie du volume folliculaire. L'ovocyte de ce follicule prédominant, qui a terminé son activité de biosynthèse et a atteint la taille de 120 μm , est entouré d'une petite masse de cellules folliculaires nommée le cumulus et fait progressivement saillie dans l'antra tout en restant connecté aux cellules de la granulosa entourant cette cavité. Le follicule prend alors le nom de follicule pré-ovulatoire ou follicule de de Graaf (Zeleznik 2004). Ce follicule a un diamètre moyen de 20 mm. En réponse aux pics de sécrétion ovulatoire de LH et de FSH, l'ovocyte primaire du follicule pré-ovulatoire va reprendre la méiose et se scinder en ovocyte primaire et 1^{er} GP (cfr supra). Parallèlement, les cellules du cumulus perdent leurs connexions intercellulaires aboutissant à la chute de l'ovocyte et d'une partie de son cumulus au sein de la cavité antrale. Les cellules du cumulus produisent une matrice extracellulaire, composée principalement d'acide hyaluronique, qui va augmenter le volume du cumulus. La vascularisation du follicule augmente, il fait progressivement saillie à la surface de l'ovaire. Finalement l'ovocyte secondaire et son cumulus sont libérés et vont migrer vers la cavité utérine alors que le follicule restant devient le corps jaune ou lutéal. C'est ce phénomène, l'ovulation, qui marque le passage entre la 1^{ère} phase du cycle menstruel, la phase folliculaire, et la seconde, la phase lutéale. Au sein du corps jaune, les cellules de la granulosa prolifèrent et deviennent une structure endocrine qui sécrète les hormones stéroïdes, œstrogènes, progestérone et androgènes, nécessaires à la maturation endométriale indispensable à l'implantation embryonnaire en cas de fécondation. Une fois libéré du follicule, l'ovocyte est viable pendant 24 heures. Si la fécondation n'a pas lieu dans le délai, le corps jaune va dégénérer et devenir du tissu cicatriciel, nommé le corps blanc, tandis que l'endomètre va desquamer pour donner les menstrues, signal du début du cycle suivant (Suh 2002, Larsen 2003, Letombe 2012).

1.4. Evolution de la réserve ovarienne avec l'âge

La réserve ovarienne est définie par le nombre de follicules primordiaux contenus au sein des ovaires. Avec le temps, la réserve ovarienne diminue par atrésie folliculaire. Cette atrésie est liée à une activation de l'apoptose au sein du follicule. Il s'agit d'une apoptose au niveau de l'ovocyte des follicules primordiaux et secondaires, puis au niveau des cellules de la granulosa lorsque les follicules atteignent le stade antral (Monniaux 2002). Le processus d'apoptose sera abordé plus en détails ci-après.

Au bout des 5 premiers mois de la vie fœtale, le nombre de follicules primordiaux a atteint son maximum, à savoir environ 7 millions. Celui-ci ne fera que diminuer par la suite, avec la persistance de 1 à 2 millions de follicules primordiaux à la naissance et 400 000 à la puberté. Au cours de la période d'activité génitale, seuls 400 à 500 follicules auront une

maturation complète aboutissant à une ovulation. L'atrésie folliculaire s'accélère encore après l'âge de 38 ans et la ménopause se manifeste lorsqu'il n'y a plus que 1000 follicules primordiaux au total au sein des deux ovaires, ce qui arrive en moyenne vers l'âge de 51 ans (Suh 2002, Larsen 2003, Hansen 2008, Wallace 2010, Letombe 2012).

Non seulement le nombre de follicules primordiaux décroît avec l'âge mais la qualité de l'ovocyte qu'ils contiennent s'altère également, surtout après l'âge de 31 ans. En effet, au cours du temps, on observe une élévation du nombre d'anomalies chromosomiques, particulièrement des aneuploïdies. Cette combinaison de diminution de la réserve ovarienne avec l'augmentation du nombre d'ovocytes altérés explique la diminution de la fertilité de la femme lorsque son âge augmente (Figure 5). Il existe néanmoins une grande variabilité entre les individus en fonction de nombreux paramètres dont certains facteurs environnementaux (exp. : le tabac) et génétiques (de Bruin 2001, Broekmans 2009).

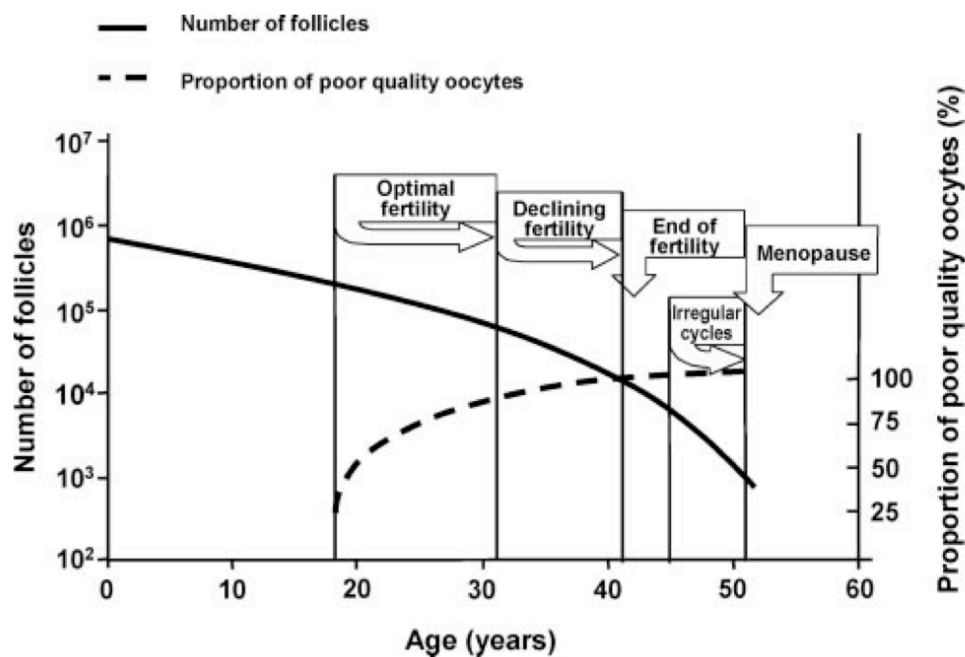


Figure 5 Relation entre la réserve ovarienne, la qualité ovocytaire et la fertilité de la femme en fonction de son âge. Représentation schématique du nombre et de la qualité chromosomique des ovocytes des follicules primordiaux présents au sein des ovaires en fonction de l'âge et les répercussions sur la fertilité. *Broekmans et al., Endocrine Reviews, 2009.*

2. L'insuffisance ovarienne prématurée

2.1. Définition

L'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) correspond à l'apparition d'une aménorrhée de plus de 4 mois avant l'âge de 40 ans, liée à une déplétion précoce des follicules

primordiaux. Il faut la différencier de la ménopause physiologique qui apparaît vers l'âge de 51 ans.

L'IOP correspond à un hypogonadisme hypergonadotrope caractérisé par des taux élevés de gonadotrophines pituitaires (LH et FSH) consécutifs à l'altération de la stéroïdogénèse ovarienne. Le diagnostic biologique est posé avec un taux de FSH > 40 mUI/ml sur deux prélèvements distincts réalisés à minimum un mois d'intervalle. Il faut distinguer l'IOP primaire, caractérisée par un impubérisme avec une aménorrhée primaire qui est principalement liée à une dysgénésie gonadique, de l'IOP secondaire caractérisée par la disparition précoce des cycles menstruels et l'apparition de signes liés à l'hypo-œstrogénie. Ces derniers sont principalement des bouffées de chaleur, une sécheresse cutanée et vaginale, une dyspareunie, des douleurs articulaires, de l'asthénie et des troubles de l'humeur. L'IOP peut également s'accompagner d'autres symptômes propres aux pathologies endocriniennes auxquelles elle peut être associée (Braham 2009, Letombe 2012).

2.2. Epidémiologie

La prévalence de l'IOP est d'environ 1 à 2 % de la population féminine mais elle varie en fonction de l'âge. En effet, elle s'observe chez 0,01 % des femmes de moins de 20 ans, chez moins de 0,1% avant 30 ans et chez 1% des patientes de moins de 40 ans (Broekmans 2009).

Il existe une variabilité ethnique : une augmentation de la prévalence chez les caucasiennes et les africaines par rapport aux asiatiques (Letombe 2012).

2.3. Etiologies

L'IOP peut être expliquée par différents mécanismes (Braham 2009) :

- Une déplétion primitive du stock de follicules primordiaux ;
- Une atrésie folliculaire accélérée avec épuisement de la réserve ;
- Un défaut de sélection ;
- Un blocage de la maturation folliculaire.

L'origine de l'IOP reste inconnue dans plus de 90 % des cas, bien que de nombreuses étiologies aient été mises en évidence au cours des dernières décennies (Tableau 1) (Broekmans 2009, Letombe 2012).

Tableau 1 Principales étiologies de l'IOP

Auto-immunes		Infectieuses	Génétiques			Iatrogènes
Endocrines	Non-endocrines		Liées à l'X	Autosomiques		
				Syndromiques	Non syndromiques	
Polyendocrinopathie auto-immune de type 1 et 2	Lupus	Oreillons	Syndrome de Turner	BPES (mutation <i>FOXL2</i>)	Mutation au niveau de :	Chimiothérapie
Maladie de Basedow	Maladie de Crohn	Herpès zoster	Anomalies de structure du chromosome X	Polyendocrinopathie auto-immune de type 1	- Récepteurs des gonadotrophines	Radiothérapie
Maladie d'Addison	Myasthénie	Cytomégalo-virus	Mutation au niveau de :	Syndrome de Perrault	- Gonadotrophines	Chirurgie pelvienne
Diabète de type 1	Polyarthrite rhumatoïde		- <i>FMR 1</i>	Ataxie-télangiectasie	- Inhibine	
			- <i>FMR 2</i>	Galactosémie	- <i>GDF9</i>	
			- <i>BMP15</i>	Déficits enzymatiques	- <i>NOBOX</i>	
					- <i>FOXO3a</i>	

FMR : Fragility Mental Retardation; *BMP15* : bone morphogenetic protein-15; *BPES* : Blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome; *FOXL2* : Forkhead Box L2; *GDF9* : growth differentiation factor-9; *NOBOX* : newborn ovary homeobox-encoding gene ; *FOXO3a* : Forkhead Box O3a.

Parmi ces différentes étiologies, l'origine iatrogène de l'IOP est en augmentation. En effet, les progrès dans la prise en charge des néoplasies observés ces dernières décennies ont permis une nette amélioration de la survie pour la plupart des cancers. Cet allongement de l'espérance de vie met en évidence la morbidité de ces traitements, notamment au niveau de la fertilité puisque la chimiothérapie et la radiothérapie sont gonadotoxiques et induisent une atrophie folliculaire accélérée.

L'impact de la chimiothérapie dépend de plusieurs paramètres dont la nature de l'agent utilisé, la dose et la durée d'administration mais également de l'âge de la patiente au moment du traitement. En effet, les différentes molécules n'ont pas un effet comparable et les agents alkylants ont une toxicité très importante au niveau des gonades (Tableau 2) en induisant une perte folliculaire massive par apoptose (Soleimani 2011). Il est évident que plus la dose utilisée est importante plus cette toxicité augmente. Celle-ci peut également être majorée lors de l'utilisation combinée de plusieurs agents de chimiothérapie. L'impact au niveau de la fonction gonadique n'est pas toujours réversible. L'aménorrhée temporaire est le résultat de la destruction des follicules plus matures alors que l'aménorrhée définitive, qui traduit une IOP et donc une ménopause iatrogène, est le résultat d'une perte majeure en follicules primordiaux (Wallace 2005).

Tableau 2 Toxicité gonadique des différents agents utilisés en chimiothérapie. Adapté d'après Wallace et al., *Lancet Oncology*, 2005.

Risque élevé	Risque moyen	Risque faible
Busulfan	Doxorubicine	Dactinomycine
Chlorambucil	Carboplatine	Bléomycine
Cyclophosphamide	Cisplatine	Mercaptopurine
Chlorméthine		Méthotrexate
Melphalan		Vincristine
Procarbazine		Vinblastine
Ifosfamide		Fluorouracile

La radiothérapie peut également induire une infertilité (Critchley 2005). Comme pour la chimiothérapie, l'effet gonadotoxique dépend de la dose cumulative administrée mais également du fractionnement des doses et du site d'irradiation. Un champ pelvien ou une irradiation corporelle totale (TBI ou *total body irradiation*) sont à très haut risque d'induire une IOP. En effet, une TBI entraîne une stérilité chez 90 % des patientes irradiées et la dose d'irradiation pelvienne entraînant la destruction de la moitié des follicules immatures humains est de moins de 2 Gy (Wallace 2003). En plus de la perte folliculaire, ces traitements induisent un remodelage tissulaire majeur. On note un remplacement du stroma ovarien par du tissu fibrotique et une altération vasculaire importante pouvant être à l'origine d'une hypoxie tissulaire. Ces différents processus entraînent une atrophie de l'ovaire qui devient par conséquent non fonctionnel (Meirow 2007). Une irradiation cérébrale, particulièrement hypothalamo-hypophysaire, peut également induire une infertilité par un hypogonadisme hypogonadotrope. La radiothérapie a également des effets délétères au niveau du muscle utérin, et ce de façon plus marquée chez les enfants pré-pubères qui ont un utérus particulièrement sensible aux rayons. L'irradiation utérine entraîne une altération vasculaire et le remplacement des fibres musculaires par de la fibrose, à l'origine d'une diminution de l'élasticité, ce qui entrave le pronostic obstétrical ultérieur de la patiente et se traduit par des taux plus élevés de fausse-couche, d'accouchement prématuré et d'enfant de petit poids à la naissance.

L'âge de la patiente lors du traitement joue un rôle important sur la gonadotoxicité de ces traitements. En effet, les patientes plus âgées sont à plus haut risque d'IOP. Ce phénomène est expliqué par la diminution physiologique du nombre de follicules ainsi que la dégradation de leur qualité au fil du temps. A la naissance, une irradiation de 20 Gy est à l'origine d'une stérilité chez 97 % des patientes alors qu'une dose de 18 Gy à 1 an, de 16 Gy à 20 ans et de seulement 14 Gy à 30 ans entraîne le même effet (Wallace 2005). En ce qui concerne la chimiothérapie, une aménorrhée complète est observée après l'administration de 5 g de cyclophosphamide chez une patiente de plus de 40 ans alors qu'une dose de 20 g

est nécessaire chez une patiente de 20 à 30 ans (Donnez 2006).

2.4. Complications

L'IOP a des conséquences sur de nombreux organes, altérant notablement la qualité de vie des patientes atteintes (Letombe 2012). Une complication importante réside en l'augmentation du risque cardio-vasculaire puisque la protection de la femme en période génitale active vis à vis de cette problématique est en grande partie liée aux œstrogènes. Ce risque peut cependant être limité si un traitement hormonal substitutif est prescrit et ce d'autant plus s'il est instauré rapidement à l'apparition de l'insuffisance ovarienne.

L'hypoœstrogénie induite par l'IOP est également responsable d'une accélération de la perte osseuse, particulièrement au niveau de l'os trabéculaire (notamment au niveau vertébrale). La supplémentation hormonale ainsi qu'une éducation concernant l'hygiène de vie et la supplémentation en vitamine D et calcium sont indispensables afin de limiter l'ostéopénie voire l'apparition d'une ostéoporose.

Il ne faut pas oublier l'impact psychologique de l'IOP. Il y a tout d'abord les signes liés à la carence en œstrogènes, tels que trouble du caractère, céphalées, insomnies, troubles du comportement alimentaire, irritabilité,... Mais il y a également l'impact psychologique lié à l'annonce du diagnostic et aux conséquences qu'il engendre, notamment sur la fertilité de la patiente (Braham 2009).

2.5. Prise en charge

Le traitement des patientes atteintes d'IOP est basé sur 2 axes principaux : la substitution hormonale et la prise en charge de l'infertilité. Il est également important d'aider la patiente grâce à une prise en charge psychologique et de l'orienter vers un conseil génétique si une anomalie chromosomique ou génique a été mise en évidence lors de la mise au point de l'IOP.

2.5.1. Traitement hormonal substitutif

En cas d'IOP primaire liée à un syndrome de Turner, un traitement à base d'hormone de croissance peut-être proposé même si celle-ci n'est pas en déficit, puisque la taille spontanée dans ce syndrome n'est que de 142 cm. La substitution hormonale œstrogénique peut également être prescrite à doses croissantes pour permettre un développement mammaire adéquat. Par la suite, vers la fin de la 2^{ème} année de traitement, un complément

par progestatif de minimum 10 jours par mois sera ajouté.

Pour les IOP secondaires, le traitement hormonal substitutif (THS) œstro-progestatif doit-être débuté rapidement afin d'éviter les complications liées à la carence en œstrogène. L'addition de progestérone est nécessaire pour la protection endométriale afin d'éviter l'hyperplasie induite par les œstrogènes. En l'absence de désir de fertilité, une contraception œstro-progestative peut être prescrite à la place du THS puisque celui-ci n'est pas contraceptif, même si le risque de grossesse est faible dans une telle pathologie (Braham 2009, Letombe 2012).

2.5.2. Prise en charge de l'infertilité

2.5.2.1. Préservation de la fertilité

L'IOP iatrogène est une problématique importante puisqu'à l'heure actuelle, on diagnostique un cancer invasif chez une femme sur 51 à l'âge de 39 ans tandis que l'âge auquel elles ont leur premier enfant a tendance à augmenter (Chung 2013). En ce qui concerne la prise en charge de l'infertilité, les différentes alternatives à visée préventive dans ce contexte ont été développées dans notre publication « Cancer et droit à la maternité » (Henry 2014) (Annexe 1).

Parmi ces différentes stratégies, le choix de la technique la plus appropriée dépend de multiples paramètres dont le type de pathologie, le traitement nécessaire et son délai de mise en place, l'âge de la patiente et la présence ou non d'un partenaire.

Pour des pathologies traitées uniquement par radiothérapie, l'ovariopexie peut être proposée afin de placer l'ovaire hors du champ d'irradiation. Lorsqu'une irradiation crânio-spinale est prescrite, l'ovaire doit être fixé dans une position la plus distale possible de la colonne. Ceci permet de préserver l'anatomie et une fertilité spontanée ultérieure. En cas d'irradiation pelvienne, le ligament utéro-ovarien et la trompe de Fallope sont sectionnés afin de mobiliser l'ovaire vers les gouttières para-coliques. Après rémission, une seconde intervention se révèle nécessaire pour repositionner l'ovaire au sein du pelvis. Cette procédure permet de diminuer fortement la dose d'irradiation au niveau ovarien même si ceux-ci peuvent encore recevoir 15 % de la dose administrée. Elle permet néanmoins une préservation de la fonction endocrine (60 % des cas) ainsi que l'obtention de grossesses spontanées. Elle peut toutefois se compliquer de douleurs pelviennes chroniques, d'ischémie de la trompe ou de lésion vasculaire (Wo 2009, Jadoul 2010).

Pour certaines pathologies nécessitant une chimiothérapie qui ne soit pas trop agressive au niveau ovarien, il a été proposé d'utiliser des analogues de la GnRH (*gonadotropin releasing hormone*). En effet, comme les ovaires d'enfants pré-pubères semblent moins sensibles à la chimiothérapie, certains ont émis l'hypothèse que mettre les ovaires de femmes adultes au repos, par l'utilisation d'analogues de la GnRH concomitamment à la chimiothérapie, permettrait de diminuer leur sensibilité à cette dernière. Plusieurs études ont été menées avec des résultats contradictoires (Beck-Fruchter 2008). Cependant, des équipes ont récemment mis en évidence un effet bénéfique de ce traitement sur la réapparition de cycles menstruels post-chimiothérapie (Shen 2015) mais également sur la fertilité après celle-ci (Demeestere 2016).

Une autre possibilité de prise en charge avant l'instauration d'un traitement gonadotoxique est la cryopréservation. Celle-ci concerne la congélation d'embryons, d'ovocytes ou de tissu ovarien (Tableau 3). La cryoconservation d'embryons est une technique utilisée en routine dans les centres d'aide médicale à la procréation (AMP). Le pourcentage de naissance d'enfant vivant atteint 20-30 % (Ferraretti 2013). Cependant, la stimulation hormonale ainsi que la ponction ovocytaire préalable à la fécondation *in vitro* (FIV) dure environ un mois et ce délai avant l'instauration d'un traitement à visée oncologique n'est que rarement acceptable. En effet, toute cette procédure doit être réalisée avant le début de la chimiothérapie puisque celle-ci est délétère et augmente le risque de fausse couche et de malformation lorsqu'elle est administrée au moment de la maturation ovocytaire, comme cela a été démontré sur des modèles animaux (Kujjo 2011). Cependant, cet effet tératogène disparaît lorsque la grossesse est obtenue plus de 6 mois après la fin de la chimiothérapie (Winther 2004, Meirow 2005). Une autre limitation de la FIV est qu'elle ne peut-être réalisée que chez une patiente pubère ayant un partenaire ou acceptant le recours à un don de sperme. Par ailleurs, une stimulation ovarienne en cas de cancer hormono-dépendant est fortement contre-indiquée. Cependant, certaines équipes réalisent une stimulation ovarienne dans le cadre d'une FIV chez des patientes présentant un cancer du sein hormono-dépendant mais avec un schéma de stimulation différent. Celui-ci associe la méthode classique (agoniste ou antagoniste du GnRH et gonadotrophines) avec, soit un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes, le tamoxifène, soit un inhibiteur de l'aromatase de troisième génération, le letrozole, ce qui permet de limiter la production d'œstrogènes lors de la stimulation et, par conséquent, de ne pas stimuler les cellules néoplasiques (Oktay 2005, Kim 2011). Il n'y a cependant pas encore eu de naissance décrite après de tels protocoles de stimulation. Il semble également que la réponse ovarienne lors d'une stimulation pour FIV est moindre chez les patientes cancéreuses que chez les patientes y ayant recours pour des raisons d'infertilité masculine (Quintero 2010,

Domingo 2012). Les mécanismes précis à l'origine de cette observation n'ont pas encore été mis en évidence, bien que certains aient émis l'hypothèse qu'elle pouvait être liée à une augmentation du métabolisme due à la maladie ce qui pourrait augmenter le taux de certaines hormones de stress, comme la prolactine, et par conséquent diminuer la sécrétion des gonadotrophines (Quintero 2010).

La cryopréservation d'ovocytes matures est une alternative à la congélation d'embryons. Elle présente l'avantage de ne pas avoir recours à une mise en fécondation avant la congélation car ce sont les ovocytes matures qui sont congelés. Elle peut donc s'adresser aux patientes célibataires. Le taux de grossesse par FIV obtenu est presque semblable à celui obtenu avec l'utilisation ovocytes frais (Cobo 2011). Néanmoins, cette technique nécessite la même procédure de stimulation et de prélèvement ovocytaire que la congélation d'embryon et en a donc les mêmes désavantages.

La maturation ovocytaire *in vitro* (MIV) préalable à la cryopréservation serait la technique idéale puisqu'elle pourrait être proposée tant aux enfants qu'aux femmes adultes, sans nécessiter la présence d'un partenaire. Il n'y aurait pas besoin de stimulation ovarienne car la maturation folliculaire serait réalisée en laboratoire à partir de biopsie de tissu ovarien. Malheureusement, l'évolution du follicule primordial en follicule pré-ovulatoire nécessaire pour une FIV est un processus très complexe. A l'heure actuelle, la maturation folliculaire complète, à partir de follicules primordiaux, suivie d'une FIV, d'un transfert d'embryons et aboutissant à la naissance de descendants vivants a seulement été obtenue chez la souris (O'Brien 2003). En raison de la plus grande taille des follicules primordiaux chez l'être humain et de la durée plus longue nécessaire à leur maturation, la transposition de ce modèle chez l'humain n'a pas encore pu être réalisé même si de nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années (Xu 2009, Telfer 2012, Telfer 2013). A l'heure actuelle, le développement *in vitro* de follicules primordiaux humains en follicules antraux a pu être obtenu à partir de tissu ovarien d'adultes (Telfer 2008). Cependant, une étude récente a mis en évidence un taux de mise en croissance *in vitro* des follicules primordiaux plus faible chez les enfants pré-pubères que chez les adultes. Ceci serait expliqué par la présence d'un processus de maturation au sein de l'ovaire lors de la transition de l'enfance à la puberté et à l'âge adulte qui se traduit par la perte d'un grand nombre de follicules primordiaux anormaux alors que les normaux acquièrent la capacité à entrer en maturation (Anderson 2014). Néanmoins, le nombre de cas étudiés par cette équipe est faible et d'autres études sur de plus grandes cohortes sont nécessaires pour affirmer ces résultats préliminaires. La MIV à partir de follicules primordiaux prélevés sur une biopsie ovarienne est donc une technique très prometteuse mais non applicable en clinique actuellement.

La congélation de biopsies ovariennes, chirurgicalement prélevées préalablement à l'instauration des traitements gonadotoxiques, est la dernière possibilité de cryopréservation. Elle sera décrite dans la suite de ce manuscrit.

Tableau 3 Caractéristiques des techniques de cryopréservation envisageables avant traitement gonadotoxique.

	Congélation embryonnaire	Congélation d'ovocytes matures	Congélation d'ovocytes avec MIV	Congélation de tissu ovarien
Puberté nécessaire	Oui	Oui	Non	Non
Conjoint nécessaire	Oui	Non	Non	Non
Stimulation ovarienne	Oui	Oui	Non	Non
Chirurgie	Non	Non	Oui	Oui
Restauration de la fonction ovarienne	Non	Non	Non	Oui
Risque de récurrence du cancer	Non	Non	Non	Potentiel

2.5.2.2. Traitement de l'infertilité

Certaines patientes présentant une IOP n'ont pas eu le temps d'accomplir leur désir de maternité avant l'apparition de l'insuffisance ovarienne et le taux de grossesse spontanée chez ces dernières est faible, variant de 5 à 10 % (van Kasteren 1999, Braham 2009). C'est pourquoi, il est nécessaire de pouvoir proposer à celles-ci, lorsqu'elles sont en désir d'enfant, certaines solutions, qui peuvent être classées en 2 catégories en fonction de l'origine des gamètes utilisées. On peut soit utiliser les ovocytes de la patiente, si cela est possible, soit avoir recours à un don d'ovocytes ou d'embryons.

Pour les patientes pouvant utiliser leurs propres gamètes, il n'y a pas de consensus défini quant à la prise en charge optimale. Certaines études ou *case reports* ont décrit l'intérêt de la prise, entre autre, d'un THS, d'une pilule contraceptive œstro-progestative préalable à une stimulation ovarienne, de déhydroépiandrostérone ou de corticoïdes mais il n'y a pas, à ce jour, d'étude prospective randomisée publiée démontrant la supériorité de tel ou tel traitement (van Kasteren 1999, Ben-Nagi 2014).

Si l'insuffisance ovarienne est telle qu'il n'est pas possible à la patiente de concevoir avec ses propres ovocytes, même avec l'aide d'AMP, le seul recours possible à la

grossesse est le don de gamètes, voire d'embryons.

3. La cryopréservation et l'autogreffe de tissu ovarien

3.1. Définition

La cryopréservation de tissu ovarien permet d'offrir à une patiente à risque d'IOP la possibilité de récupérer des cycles ovulatoires et éventuellement d'obtenir une grossesse une fois l'IOP installée grâce à l'autogreffe de fragments préalablement congelés et préservés. Cette technique a pris son essor depuis une vingtaine d'années en clinique suite à l'amélioration de la survie, après traitement anticancéreux, des enfants, adolescentes et jeunes adultes et est proposée dans de nombreux centres de par le monde (Donnez 1998, Aubard 2001, Oktay 2004, Sonmezer 2004, Wallace 2005, Demeestere 2006, Bedaiwy 2008, Varghese 2008, Jeruss 2009, von Wolff 2009, Rodriguez-Wallberg 2011, Rosendahl 2011, Chung 2013, Donnez 2013, Ethics Committee of American Society for Reproductive 2013, Desvignes 2014). Les deux avantages majeurs de cette procédure, par rapport aux autres techniques disponibles, sont sa réalisation possible dans un délai court qui ne reporte ainsi pas le traitement à visée oncologique, et son utilisation en présence de patientes impubères (Tableau 3).

3.2. Indications

La cryopréservation de tissu ovarien peut être proposée dans de nombreuses pathologies tant bénignes que néoplasiques (Tableau 4).

Il faut cependant respecter certaines lignes de conduite et ne pas réaliser cette procédure à tout venant. Plusieurs équipes ont publié leurs critères d'inclusion pour la cryopréservation ovarienne (Wallace 2005, Backhus 2007, von Wolff 2011, Kim 2012). Parmi ceux-ci, citons :

- Patiente âgée de moins de 35 ans. Néanmoins, la prise en charge des patientes peut être adaptée en fonction de l'évaluation de la réserve ovarienne grâce au dosage de la FSH et de l'AMH (*anti-müllerian hormone*) ainsi qu'au compte des follicules antraux à l'échographie pelvienne ;
- Traitement à haut risque d'induire une IOP ;
- Cavité utérine intacte ;
- Présence des 2 ovaires ;

- Capacité à donner son consentement éclairé (patiente ou responsable en cas d'enfant ou d'adolescent).

Il existe également des critères d'exclusion de prise en charge, à savoir :

- Antécédent de traitement à haut risque de IOP ;
- Défaillance ovarienne démontrée ;
- Sérologie positive (Hépatites ou HIV) ;
- Contre-indication opératoire.

Tableau 4 Principales indications de la cryopréservation ovarienne. Adapté d'après *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*, Poncelet C. et Sifer C, Edition Springer, 2011.

Indications malignes	Extra-pelviennes		Cancers osseux (ostéosarcome, sarcome d'Ewing)	
			Cancer du sein	
			Mélanome	
			Neuroblastome	
	Pelviennes		Non-gynécologiques	Cancers intestinaux
				Sarcome pelvien
			Gynécologiques	Sarcoblastome
				Rhabdomyosarcome
	Systémiques		Tumeurs sacrées	
			Tumeurs du recto-sigmoïde	
			Carcinomes précoces du col utérin, du vagin ou de la vulve	
			Certains cas de carcinomes ovariens (stade IA)	
	Ovariectomies uni- ou bilatérales		Tumeurs borderlines de l'ovaire	
Lymphomes Hodgkinien				
Lymphomes non-Hodgkiniens				
Leucémies				
Risques de ménopause prématurée		Médulloblastome		
		Syndrome de Turner		
		Histoire familiale		
		Maladies auto-immunes nécessitant une chimiothérapie (lupus érythémateux disséminé, polyarthrite rhumatoïde, maladie de Behçet, granulomatose de Wegener)		
Risques de ménopause prématurée		Maladies hématologiques (anémie falciforme, thalassémie majeure, anémie aplasique) ou auto-immunes nécessitant une greffe de moelle		

3.3. Historique et état de l'art

L'historique de la cryopréservation de tissu ovarien se divise en deux périodes principales. La première concerne les études pionnières qui ont été menées dans les années 1950, telles que citées dans les références de Poirot et Poncelet (Poirot 2002, Poncelet 2011). A cette époque, certains protocoles de congélation de tissu ovarien, principalement murins, ont été décrits. La technique la plus utilisée était alors celle expérimentée par Parkes (Parkes 1953), utilisant du glycérol comme cryoprotecteur et une descente en température lente jusqu'à -79°C . Il a alors été démontré que la survie folliculaire était dépendante de trois facteurs principaux : l'âge, le stade de maturation des follicules et leur localisation. En 1960, l'équipe de Parrott a obtenu les premières naissances de souriceaux après greffe orthotopique de tissu préalablement congelé (Parrott 1960). Cependant, le nombre d'ovocytes survivants après ces techniques de congélation et greffe était très faible, estimé à environ 5% (Green 1956, Aubard 2001).

Malheureusement, la recherche sur le sujet a été abandonnée jusqu'au début des années 1990 où débute la période moderne de la cryopréservation ovarienne (Qu 2000, Poirot 2002, Poncelet 2011), motivée par la nette amélioration de la survie après cancer. Entre-temps s'est développée la cryobiologie avec la découverte de nouveaux agents cryoprotecteurs et l'apparition de machines permettant de contrôler la congélation. En 1994, l'équipe de Gosden a pu obtenir la première naissance chez un grand mammifère, la brebis, après autogreffe de fragments ovariens cryopréservés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Gosden 1994). Ce résultat a pu être reproduit par Salle en 2002 avec la naissance de 4 agneaux (Salle 2002). Dans la seconde moitié des années 90, il a été montré, sur du tissu humain, la présence de follicules morphologiquement normaux après congélation-décongélation (Hovatta 1996) ainsi qu'un bon taux de survie folliculaire après 18 jours de xénogreffe chez des souris immunodéprimées (Newton 1996). Une multitude d'études ont par la suite été publiées portant sur différents moyens visant à améliorer la technique de congélation.

L'application en clinique humaine a débuté à Londres en 1996 (Bahadur 1996) avec la première congélation de tissu ovarien. Il a fallu attendre l'an 2000 pour voir la première réimplantation de fragments cryopréservés (Oktay 2000). Celle-ci a permis un développement folliculaire après stimulation ainsi qu'une augmentation du taux d'œstradiol. La seconde autotransplantation a été réalisée en 2001 (Radford 2001) et a abouti à une reprise spontanée de la fonction ovarienne associée à une diminution du taux de FSH. Donnez et al. ont reporté la première naissance après réimplantation orthotopique de

fragments ovariens cryopréservés en 2004 (Donnez 2004) et plusieurs naissances ont par la suite été décrites (Meirow 2005, Demeestere 2006, Andersen 2008, von Wolff 2009, Demeestere 2010, Roux 2010, Sanchez-Serrano 2010, Silber 2010, Donnez 2011, Donnez 2011, Forges 2011, Revel 2011, Rosendahl 2011, Ditrach 2012, Muller 2012, Callejo 2013, Donnez 2013, Revelli 2013). A l'heure actuelle, plus de 60 naissances ont été rapportées dans la littérature (Meirow 2014, Anderson 2015, Donnez 2015), certaines étant issues d'une conception spontanée et d'autres après stimulation ovarienne et FIV. La première naissance obtenue chez une patiente de 27 ans, dont la cryopréservation avait été réalisée lorsqu'elle avait l'âge de 13 ans et qu'elle n'avait pas encore eu sa ménarche, a été publiée tout récemment par l'équipe de l'ULB (Demeestere 2015), ce qui marque une nouvelle étape importante dans l'histoire de la cryopréservation ovarienne.

L'autogreffe de tissu ovarien cryopréservé est le plus souvent proposée en cas de souhait de grossesse mais elle peut également l'être afin d'induire la puberté à des enfants ayant reçu des traitements gonadotoxiques. Deux inductions de la puberté ont été décrites après une telle procédure (Poirot 2012, Ernst 2013).

Il est difficile de connaître les taux de reprise de la fonction ovarienne et de grossesse après une telle intervention car peu d'expériences infructueuses ont été publiées. Cependant, une étude reprenant toutes les tentatives de 3 grands centres européens, correspondant à 60 cas, a été réalisée en 2013 (Donnez 2013). Une reprise de la fonction ovarienne est observée dans plus de 90% des cas et celle-ci apparaît dans un délai de 3,5 à 6,5 mois (moyenne : 4,5 mois) après la greffe. Ce délai est expliqué par le temps nécessaire à l'évolution des follicules non matures en follicules pré-ovulatoires (Gougeon 1996). Des grossesses ont été observées chez 20% des patientes et plus de la moitié de celles-ci étaient spontanées, ce qui plaide en faveur de la localisation orthotopique de l'autotransplantation. Il n'y a en effet qu'une seule grossesse décrite après greffe hétérotopique au niveau de la paroi abdominale antérieure suivie d'une stimulation ovarienne, d'une ponction ovocytaire et d'une FIV (Stern 2013).

3.4. Technique

3.4.1. Prélèvement

La technique vise à congeler le cortex ovarien, c'est en effet celui-ci qui contient la réserve folliculaire constituée par les follicules primordiaux. Ces derniers, outre qu'ils représentent 90 à 95 % des follicules au sein de l'ovaire, ont une résistance plus élevée aux

lésions thermiques que les follicules plus matures en raison de leur plus petite taille, de leur métabolisme plus faible et de leur moindre degré de différenciation comme en témoigne l'absence de zone pellucide et le blocage de l'ovocyte en fin de prophase de la première division méiotique (Donnez 2000, Seli 2005, Chang 2008, Poncelet 2011).

Le cortex ovarien est prélevé chirurgicalement, le plus souvent par laparoscopie. Il ne s'agit pas d'une intervention lourde car elle est courte (30 minutes (min) environ) et peu morbide. Elle est donc réalisable chez la majorité des patientes. Le choix entre l'ovariectomie unilatérale et le prélèvement de larges biopsies doit être déterminé en fonction de l'agressivité des traitements envisagés sur l'ovaire. En effet, bien qu'il ait été démontré que le potentiel de fertilité des femmes n'ayant plus qu'un seul ovaire était équivalent à celui des femmes possédant leurs deux ovaires (Lass 1999, Bellati 2014, Khan 2014), il n'est cependant pas exclu qu'après traitement gonadotoxique, le fait d'avoir réalisé une ovariectomie unilatérale n'ait un effet délétère sur la fonction gonadique de ces patientes. Si le choix se porte sur la résection limitée de tissu ovarien, celle-ci doit être réalisée au bistouri ou aux ciseaux à froid, afin de ne pas détruire les follicules en utilisant l'énergie mono- ou bipolaire.

3.4.2. Transport et préparation

Directement après le prélèvement, le tissu doit être transporté du bloc opératoire au laboratoire. De nombreux protocoles ont été testés dans la littérature, selon le milieu utilisé et la température lors du transport. De nombreuses équipes ayant relaté des naissances après cryopréservation ovarienne ont utilisé du milieu Leibovitz L-15® et un transport à 4°C (Demeestere 2006, Silber 2008, Poncelet 2011).

Le laboratoire doit idéalement être situé à proximité du lieu de prélèvement afin de limiter la durée du transport. Néanmoins, on a observé un bon taux de survie folliculaire après un transport de 4h (Schmidt 2003) ainsi que la naissance d'enfants chez deux patientes dont le tissu ovarien a été transporté 4 à 5 h avant à la cryopréservation (Andersen 2008). Une équipe a même relaté une naissance après autotransplantation chez une patiente atteinte d'un lymphome de Hodgkin ayant nécessité une greffe de moëlle et pour qui le transport du tissu ovarien a duré 20h (Dittrich 2012).

Au laboratoire d'AMP, les biopsies sont nettoyées pour ne garder une épaisseur d'1 à 1,5 mm (Silber 2008, Donnez 2013) (Figure 6). Cette épaisseur, qui englobe le cortex contenant les follicules primordiaux et une fine lame de médullaire, est idéale pour la pénétration des cryoprotectants pendant la congélation et la revascularisation après

transplantation.

Une possibilité supplémentaire offerte par le prélèvement de tissu ovarien est la MIV à partir des follicules antraux ponctionnés au sein des biopsies avant congélation. Cette technique a été décrite pour la première fois en 2008 par une équipe canadienne (Huang 2008) et a déjà permis plusieurs naissances (Prasath 2014, Segers 2015, Uzelac 2015). Les follicules antraux ne supportant pas la congélation, elle permet d'utiliser le tissu ovarien au mieux. Une fois les follicules antraux ponctionnés, la MIV est réalisée et les ovocytes maturés sont alors vitrifiés et pourront être utilisés en FIV lorsque la patiente aura un désir de grossesse. Une fois le cortex nettoyé de la médullaire, il est coupé en fragments dont la taille varie de 4 à 75 mm², selon les équipes (Meirow 2005, Demeestere 2006, Dittrich 2012, Dolmans 2013). Une équipe a mis en évidence une meilleure préservation des follicules primordiaux et primaires après décongélation lorsque les fragments cryopréservés ont une largeur de 2 mm maximum, mais cela a été réalisé sur du tissu bovin et l'épaisseur des fragments était plus importante, à savoir 3 mm, que celle préconisée dans la littérature (Ferreira 2010). Il n'y a, à l'heure actuelle, pas encore de véritables lignes directrices publiées quant à la taille des fragments la plus efficace afin de préserver au mieux la réserve folliculaire lors de la congélation.

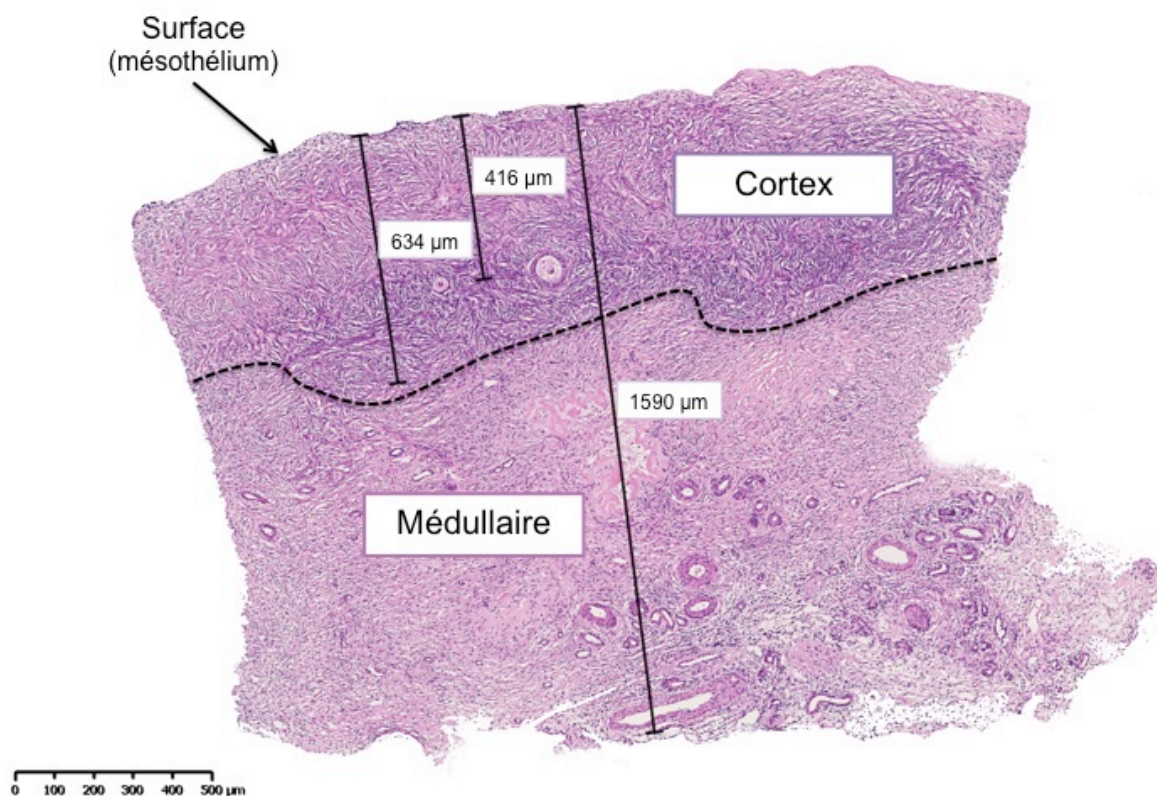


Figure 6 Biopsie de cortex ovarien. La distance entre le mésothélium et les follicules primordiaux au sein du cortex ovarien est d'environ 415 µm, le cortex mesurant un peu plus de 600 µm. Ceci souligne l'importance de l'épaisseur des biopsies ovariennes qui doit être idéalement de 1 à 1,5 mm.

3.4.3. Congélation

3.4.3.1. Bases de la cryobiologie

Le principe de la cryobiologie est de bloquer l'activité enzymatique des cellules vivantes par le froid, ce qui permet leur stockage pour une longue période en conservant leur intégrité fonctionnelle. En effet, une réaction biochimique dure une seconde à 27°C, tandis qu'elle dure environ 4 secondes à 4°C et 2 millions d'années à -170°C. La congélation d'organismes vivants dans l'azote liquide, à -196°C, permet d'interrompre le « cours du temps biologique » en figeant les cellules, ce qui permet de les conserver vivantes durant une longue période (Courbiere 2009).

Pour atteindre cette température de -196°C, il faut passer par une étape critique, sous 0°C, très délétère pour les cellules que ce soit lors de la congélation ou du réchauffement. L'eau compose en effet 60 à 80% des tissus organiques et, lorsqu'elle se cristallise en glace, son volume augmente de 9% ce qui peut induire des lésions cellulaires irréversibles (Zachariassen 2000). La formation des cristaux de glace dépend de la vitesse de refroidissement (Figure 7). Si la congélation est rapide, le nombre de cristaux est plus élevé mais ceux-ci ont une taille plus petite que lors d'une congélation lente. La baisse de la survie cellulaire lors de la congélation est donc liée à la formation de glace intracellulaire en cas de congélation rapide. Le phénomène est différent lors d'une congélation très lente. En effet, les cristaux de glaces, composés uniquement d'eau pure, se forment d'abord dans le liquide extracellulaire, aboutissant à l'élévation de la tonicité du milieu et, par phénomène osmotique, à une déshydratation intracellulaire. Or, lorsque le volume cellulaire diminue de plus de 35%, des lésions irréversibles par contrainte mécanique apparaissent ayant pour conséquence la mort cellulaire (Meryman 2007). En pratique, il existe deux techniques principales de cryopréservation de tissus biologiques permettant une survie cellulaire optimale. Celles-ci se différencient par la vitesse de refroidissement, il s'agit de la congélation lente et de la vitrification qui est ultra-rapide.

La congélation lente est le compromis entre la vitesse ultra-lente, à l'origine de la déshydratation cellulaire, et la vitesse rapide, à l'origine de la formation de cristaux intracellulaires. La rapidité de la descente en température doit être déterminée de façon optimale en fonction du type cellulaire que l'on souhaite cryopréserver (Mazur 1970) mais également du type de cryoprotecteur utilisé et de sa concentration. La congélation comporte plusieurs paliers avec des vitesses de descente en température différentes. Il s'agit d'un refroidissement contrôlé qui peut être réalisé par un congélateur programmable.

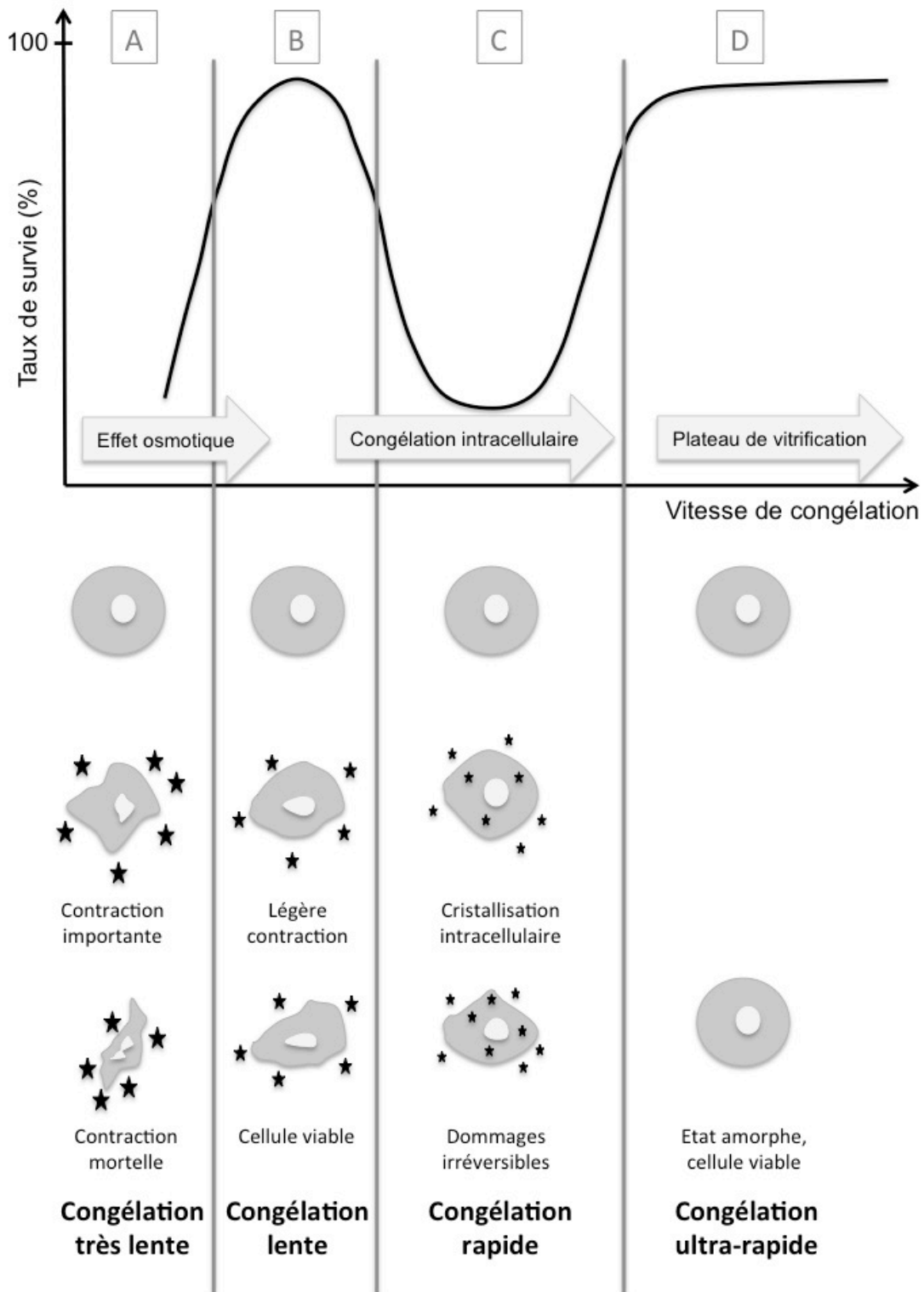


Figure 7 Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de congélation. La survie cellulaire est la plus importante lorsque la congélation est lente, quand la déshydratation est légère et la formation de cristaux intracellulaire minime, ou lorsqu'elle est ultra-rapide par vitrification. Adapté d'après Courbière *et al.*, *Gynecol Obstet Fertil*, 2009.

La vitrification, ou congélation ultra-rapide, quant à elle, correspond à la transformation de liquide en état vitreux, ou amorphe, par un refroidissement extrêmement rapide qui fige

les molécules dans un état solide désordonné. Cette procédure est extrêmement intéressante puisqu'elle évite la formation des cristaux de glace tant lors de la congélation que lors de la décongélation. Celle-ci est réalisée par immersion directe dans l'azote liquide mais nécessite de hautes doses en cryoprotecteurs (Kuleshova 2002).

Les cryoprotecteurs sont des composés chimiques utilisés afin de limiter les effets délétères de la congélation sur les cellules. Ils possèdent des groupes électronégatifs à l'origine de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau, ce qui diminue la mobilité de ces dernières et par conséquent augmente la viscosité de la solution. Il en résulte une diminution de la température de congélation ainsi que de la formation de cristaux de glace. Ces effets sont proportionnels à la concentration en agents cryoprotecteurs mais ils deviennent toxiques à haute concentration. Il en existe deux types : les intracellulaires ou pénétrants et les extracellulaires ou non pénétrants.

Les cryoprotecteurs pénétrants sont des substances organiques très solubles et de faible poids moléculaire qui, en pénétrant dans les cellules, augmentent la concentration des solutés intracellulaires et y diminuent la formation de cristaux. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un des agents les plus souvent utilisés. Il s'agit d'un solvant des corps gras, de faible poids moléculaire (PM : 78), qui traverse rapidement les membranes cellulaires (Baudot 2000). D'autres cryoprotecteurs pénétrants sont également utilisés en médecine de la reproduction, tels que le propylène glycol (PROH ou 1,2-propanediol), l'éthylène glycol (EG) et le glycérol. Le PROH ainsi que l'EG sont deux dialcools (PM respectivement de 76 et 62) qui pénètrent rapidement au sein des cellules. Le PROH est caractérisé par une stabilité importante à l'état amorphe. Le glycérol est un trialcool (PM : 92) qui pénètre au sein des cellules par mécanisme actif en fixant l'eau et en augmentant la résistance des membranes plasmiques à la congélation (Courbiere 2009, Torre 2012). Il a cependant été démontré que le PROH et le glycérol pénètrent moins vite dans les cellules de cortex ovarien humain à 4°C que l'EG et de DMSO (Newton 1998), qui sont donc à utiliser préférentiellement dans la cryopréservation ovarienne.

Le deuxième type de cryoprotecteurs sont des molécules, sucres ou polymères, de haut poids moléculaire, qui ne pénètrent pas dans les cellules et sont donc nommés non pénétrants ou extracellulaires. Ils agissent en augmentant la viscosité des solutions ce qui induit une déshydratation cellulaire par phénomène osmotique permettant donc de limiter la formation de cristaux dans les cellules. Ils sont habituellement utilisés en combinaison avec les cryoprotecteurs intracellulaires. Les sucres, dont les disaccharides tels que le sucrose ou le saccharose, ont la propriété supplémentaire de limiter la toxicité des autres

cryoprotecteurs sur les membranes cellulaires en augmentant la résistance de ces dernières grâce à leurs liaisons avec les phospholipides mais également en évitant la réhydratation cellulaire trop rapide lors du retrait des cryoprotecteurs pénétrants. Certains polymères peuvent également être utilisés, surtout en cas de vitrification, afin d'augmenter la viscosité des solutions et de diminuer les concentrations nécessaires en cryoprotecteurs pénétrants, réduisant ainsi la toxicité de ces derniers (Courbiere 2009, Torre 2012).

L'utilisation des agents cryoprotecteurs est nécessaire à la cryopréservation de cellules ou tissus mais leurs effets, qui sont doses-dépendants, sont cependant limités puisqu'ils deviennent toxiques à haute concentration. Cette toxicité résulte de la concentration, du type d'agent, de la durée d'exposition ainsi que de la température (Pegg 2007). Les mécanismes à l'origine de leur toxicité sont de deux origines. La première est liée au stress osmotique entraînant la déshydratation cellulaire. Pour pallier à celle-ci, il est préférable que l'exposition aux agents cryoprotecteurs soit progressive avec l'utilisation de solutions à concentration croissante lors de la congélation et décroissante lors de la décongélation. Le second mécanisme est lié au type biochimique de l'agent et est donc variable en fonction de celui utilisé. Il faut cependant noter que ces effets toxiques ont tendance à diminuer lorsque la température lors de l'exposition diminue. Ces effets nocifs peuvent également être palliés par l'utilisation concomitante de différents agents puisque certaines toxicités s'annulent (Courbiere 2009).

3.4.3.2. En pratique

La difficulté principale de la cryopréservation ovarienne est qu'il s'agit d'un tissu complexe et non pas de cellules isolées. Ceci implique l'utilisation d'un protocole de congélation adéquat pour le tissu entier alors que celui-ci est composé d'une population hétérogène de cellules, ayant chacune leur condition optimale de congélation (vitesse et concentration en cryoprotecteurs). Un autre problème est lié au fait que la formation de cristaux extracellulaires, relativement inoffensifs dans le cas des cellules isolées, peut modifier la fonctionnalité et donc la survie tissulaire. La taille du fragment modifie également les variations de température et surtout l'uniformité de ces variations en fonction de la profondeur au sein du tissu (Pegg 2007, Courbiere 2009). Tout ceci explique qu'il existe de nombreux protocoles de congélation dans la littérature, tant par congélation lente que par vitrification, et qu'il n'y a pas encore de lignes directrices précises publiées à ce sujet. Cependant, la plupart des équipes proposant la cryopréservation ovarienne utilisent la congélation lente. Certaines études récentes semblent montrer une égalité voire une supériorité de la vitrification sur la survie folliculaire et l'intégrité du stroma (Keros 2009, Ting

2011, Amorim 2012, Salehnia 2012, Ting 2013, Fabbri 2014) mais elle reste est cependant controversée (Isachenko 2009, Oktem 2011). C'est par conséquent la congélation lente qui sera détaillée ci-après.

Préalablement à la congélation, il faut réaliser une équilibration des fragments ovariens dans le milieu de congélation. De nombreux procédés ont été étudiés mais un des protocoles utilisés le plus régulièrement comporte l'utilisation du milieu Leibovitz L-15 additionné de sérum et de DMSO 1,5 M, qui peut être associé à un cryoprotecteur extracellulaire tel que le saccharose, pendant une durée variable, régulièrement de 30 min, à une température de 4°C (Callejo 2001, Demeestere 2006, Poncelet 2011). Le temps d'exposition résulte d'un équilibre entre la durée requise pour la pénétration des agents cryoprotecteurs au centre du tissu et les effets toxiques d'une surexposition à ces agents. La solution étant hyper-osmotique, les cellules passent par une phase de déshydratation avant de récupérer leur volume initial suite à l'entrée du cryoprotecteur perméable (Poncelet 2011).

Pour la congélation lente, un appareil de descente en température programmable est utilisé. La vitesse de descente en température est d'abord de 2°C/min jusqu'à la température où le *seeding* doit être réalisé, soit entre -6°C et -9°C. Le *seeding* correspond à l'induction manuelle de la cristallisation, dans le compartiment extracellulaire uniquement, à une température plus élevée que celle où la cristallisation se déroule spontanément. Ceci permet une augmentation de la concentration des solutés dissous dans le milieu et une déshydratation cellulaire réactionnelle par phénomène osmotique qui protège les cellules. Celui-ci peut être réalisé par entrée massive de vapeurs d'azote liquide dans la cuve du congélateur de façon automatique ou par l'application, automatique ou manuelle, d'une barre métallique préalablement refroidie dans l'azote liquide au niveau de la surface des cryotubes. Par la suite, la vitesse de refroidissement diminue, le plus souvent à 0,3°C/min, jusqu'à une température comprise entre -30°C et -50°C à laquelle la déshydratation cellulaire s'arrête et les membranes cellulaires deviennent imperméables. La vitesse s'accélère alors, de 5 à 50°C/min jusqu'à -140°C ou -150°C. A ce stade, la structure cristalline est stable et les fragments peuvent être plongés directement dans l'azote liquide, sans crainte de lésion cellulaire, et y être conservés pour de nombreuses années (Gook 2004, Poncelet 2011).

3.4.4. Décongélation

Comme pour la congélation, il existe différents protocoles de décongélation des fragments de cortex ovarien. Ceux-ci varient notamment en fonction des cryoprotecteurs utilisés. Un protocole assez répandu comprend la décongélation du tissu dans les cryotubes à température ambiante pendant 30 secondes à 2 min avant que ceux-ci ne soient plongés dans un bain-marie à 37°C jusqu'à décongélation complète. Les fragments sont par la suite placés dans du milieu de culture et rincés durant 5 min minimum à 3 reprises dans du milieu neuf (Hovatta 1996, Poncelet 2011) contenant éventuellement une concentration décroissante en cryoprotecteurs (Demeestere 2006, Meirow 2007).

3.4.5. Greffe

L'autotransplantation des fragments ovariens cryopréservés est proposée à la patiente lorsque celle-ci souhaite une grossesse alors que le diagnostic d'IOP est posé et qu'elle est en rémission de sa maladie. Il existe deux types de transplantation en fonction du site choisi qui peut-être orthotopique ou hétérotopique. Comme déjà mentionné préalablement dans ce manuscrit, la transplantation orthotopique est la procédure la plus répandue. Celle-ci peut être réalisée sur l'ovaire restant ou dans une fenêtre péritonéale en cas d'antécédent d'ovariectomie (Figure 8).

En cas de greffe sur l'ovaire atrophique restant, plusieurs protocoles ont été décrits dans la littérature. Un élément récurrent dans les différentes techniques est la nécessité de mettre les greffons au contact de la médullaire ovarienne, qui est bien vascularisée, et non directement sur le cortex, afin de favoriser la néovascularisation et la reperfusion des pièces transplantées. Ces protocoles diffèrent quant au moyen de fixation des fragments sur la médullaire. Certains préconisent la décortication de l'ovaire restant et la suture des fragments sur la médullaire mise à nu, d'autres préfèrent l'insertion de fragments dans une cavité réalisée sous le cortex (Meirow 2005, Bedaiwy 2008). Cette décortication permet également d'analyser le cortex retiré de l'ovaire atrophique et de démontrer l'absence des follicules primordiaux, preuve nécessaire à la confirmation que l'ovocyte à l'origine d'une future grossesse provient du greffon et non de l'ovaire restant.

Si la greffe sur l'ovaire restant n'est pas possible, une fenêtre péritonéale sera réalisée à proximité de la trompe ou sur le ligament large mais cette dernière option ne permettra pas une grossesse spontanée étant donné la modification anatomique (Poncelet 2011).

Certaines équipes réalisent la greffe en un temps opératoire et d'autres en 2 temps.

Cette dernière option induit une néovascularisation au niveau du futur site péritonéal de greffe via un état inflammatoire et la formation de tissu de granulation, permettant d'avoir un climat angiogénique favorable à la revascularisation du greffon (Demeestere 2006, Demeestere 2009). Un test au bleu peut-être réalisé au cours de cette première étape afin d'évaluer la perméabilité tubaire.

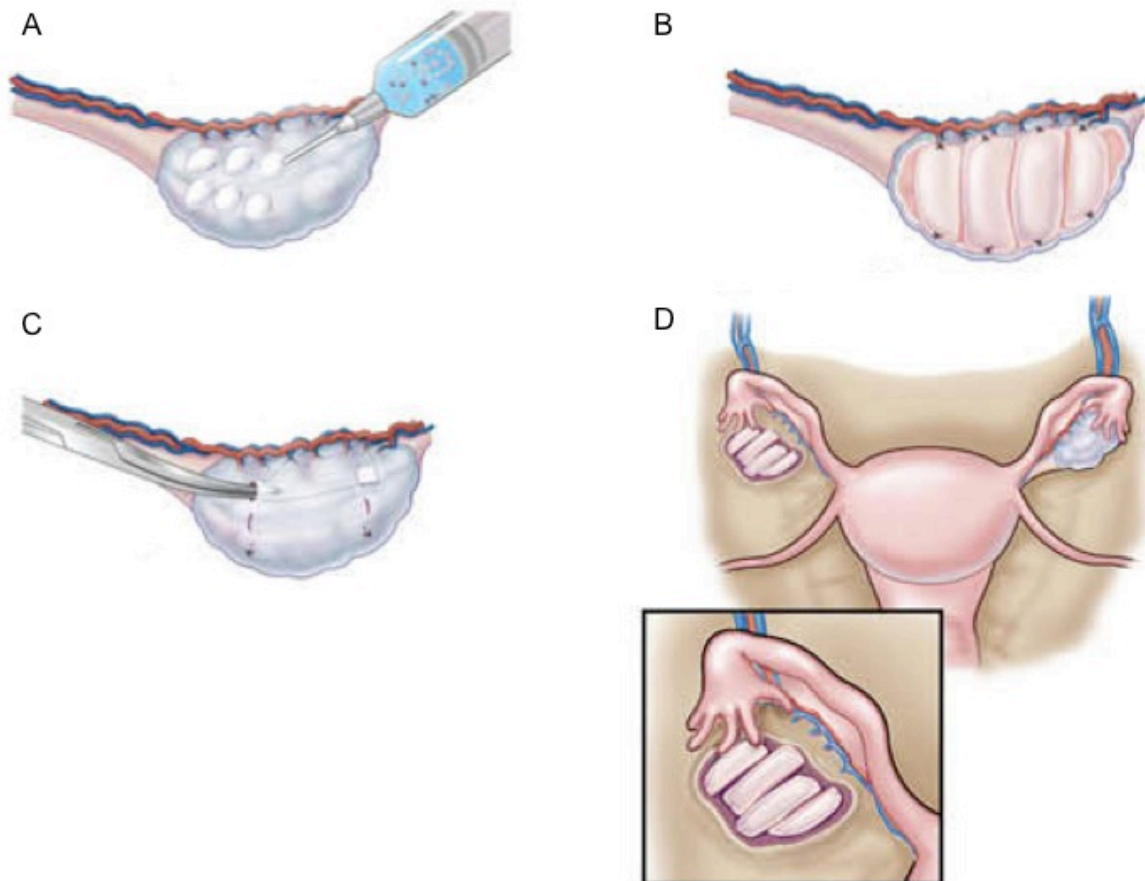


Figure 8 Différents sites possibles de réimplantation orthotopique des fragments de cortex ovariens cryopréservés. Les fragments de cortex ovariens peuvent être replacés au niveau de l'ovaire restant, **A** par injection sous le cortex, **B** par suture après décortication de l'ovaire en place ou **C** par insertion sous le cortex. **D** En cas d'impossibilité de réimplanter les fragments sur l'ovaire, ceux-ci peuvent être placés dans une poche péritonéale créée au niveau de la fossette ovarienne. Adapté d'après *Bedaiwy et al., Fertil Steril, 2008*.

3.5. Limitations de la cryopréservation ovarienne

3.5.1. Hypoxie tissulaire

3.5.1.1. Hypoxie et lésions tissulaires lors de la transplantation

Comme décrit ci-dessus, étant donné la taille des fragments de cortex ovarien à greffer, ceux-ci sont déposés ou suturés au niveau du tissu hôte sans qu'il n'y ait de connexion vasculaire. Le greffon est donc revascularisé secondairement grâce à un phénomène de néoangiogenèse. La période nécessaire afin de rétablir une perfusion correcte du transplant ovarien varie entre les espèces. Un délai de 3 jours a été mis en évidence chez la souris (Nugent 1998) alors qu'une semaine a été nécessaire chez le rat (Dissen 1994). En ce qui concerne le tissu humain, il a été démontré qu'un délai de 3 à 5 jours, selon les modèles, est nécessaire avant la reperfusion correcte du tissu. Ce délai était de 3 jours dans un modèle de greffe sur une membrane chorio-allantoïdienne ou CAM (*chorioallantoic membrane*) d'embryon de poulet (Martinez-Madrid 2009) et de 5 jours dans un modèle de xénogreffe sur souris NUDE (Van Eyck 2009) (Figure 9). Par conséquent, il existe une période hypoxique d'ischémie chaude, lors des premiers jours de greffe, suivie d'une période de reperfusion lors de laquelle des radicaux libres de l'oxygène sont produits.

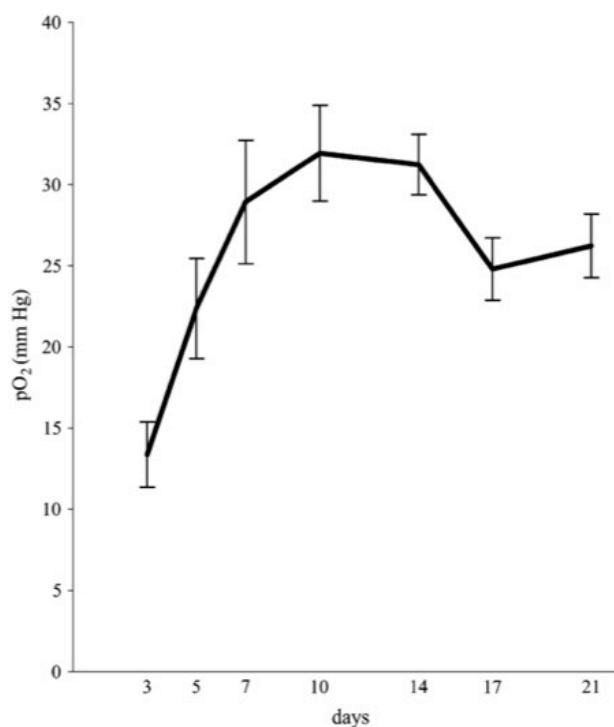


Figure 9 Evolution de la pO₂ au sein de transplants ovariens humains greffés chez des souris NUDE. La pO₂ a été évaluée par EPR (résonance paramagnétique électronique). Il faut un délai de 5 jours avant que le tissu ne soit reperfusé et que la pO₂ n'atteigne le seuil de 20 mm Hg. Par la suite, la pO₂ augmente encore avant de redescendre et de se stabiliser, au 17^{ème} jour après la greffe, aux environs de 25 mm Hg. Van Eyck et al., *Fertil Steril*, 2009.

3.5.1.2. Angiogenèse

3.5.1.2.1. Généralités

L'apport tissulaire en nutriments, nécessaire à son fonctionnement, est possible grâce aux vaisseaux sanguins. Leur formation résulte de deux principaux mécanismes, la vasculogenèse et l'angiogenèse (Figure 10).

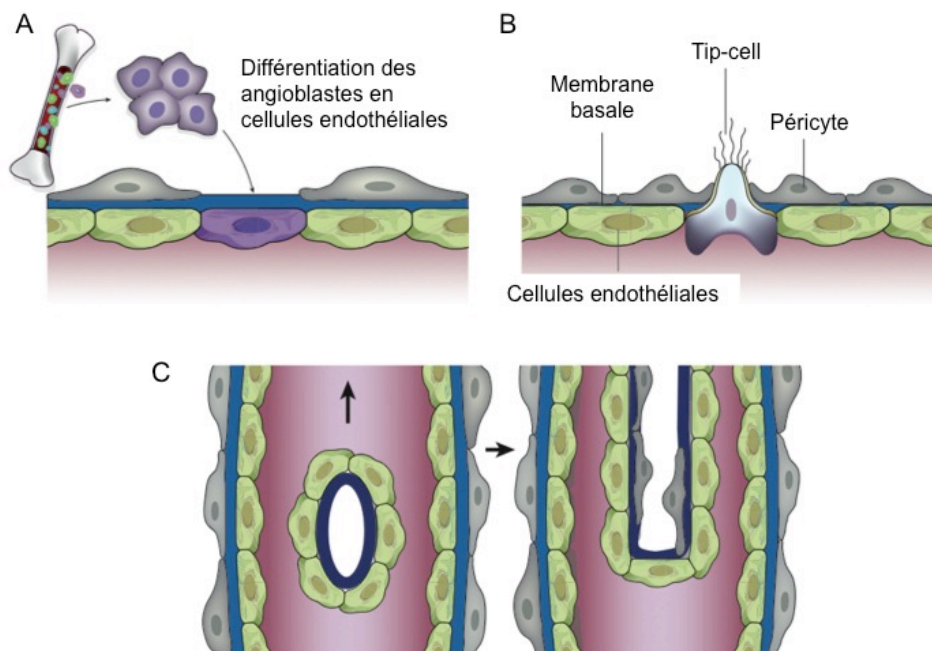


Figure 10 Vasculogenèse et angiogenèse. A La vasculogenèse a lieu grâce au recrutement d'angioblastes (dérivé de la moelle osseuse ou de parois vasculaires) qui se différencient en cellules endothéliales. L'angiogenèse peut avoir lieu par bourgeonnement via les *tip-cells* (B) ou par intussusception (C). Adapté d'après Carmeliet et al., Nature 2011.

La vasculogenèse (Figure 10A) est à l'origine de la formation du réseau sanguin primitif des embryons mammifères, grâce à la différenciation des angioblastes (cellules indifférenciées) en cellules endothéliales qui s'assemblent alors en labyrinthe vasculaire (Carmeliet 2011). Elle peut également exister chez l'adulte en certaines circonstances. L'angiogenèse, quant à elle, correspond à l'expansion de ce réseau vasculaire qui peut avoir lieu par exemple lors de l'inflammation, de la cicatrisation ou lors du remodelage tissulaire physiologique du système génital féminin, tel que le cycle menstruel. Elle peut avoir lieu par bourgeonnement (Figure 10B), expansion latérale du vaisseau grâce aux *tip-cells* (cellules à filopodes) ou par intussusception (Figure 10C), division longitudinale d'un vaisseau mère en deux vaisseaux filles.

L'angiogenèse se déroule en plusieurs étapes complexes successives (Figure 11) (Carmeliet 2011). En cas d'hypoxie, d'inflammation ou de processus tumoral, un vaisseau quiescent peut recevoir des signaux angiogéniques, tels que VEGF (*vascular endothelial growth factor*), VEGF-C, ANG-2 (angiopoiétine-2), FGF (*fibroblast growth factor*) ou des chémokines. C'est grâce à une voie induite par l'hypoxie et médiée par HIF-1 α (*hypoxia inducible factors*) que les cellules endothéliales sont sensibles aux signaux angiogéniques.

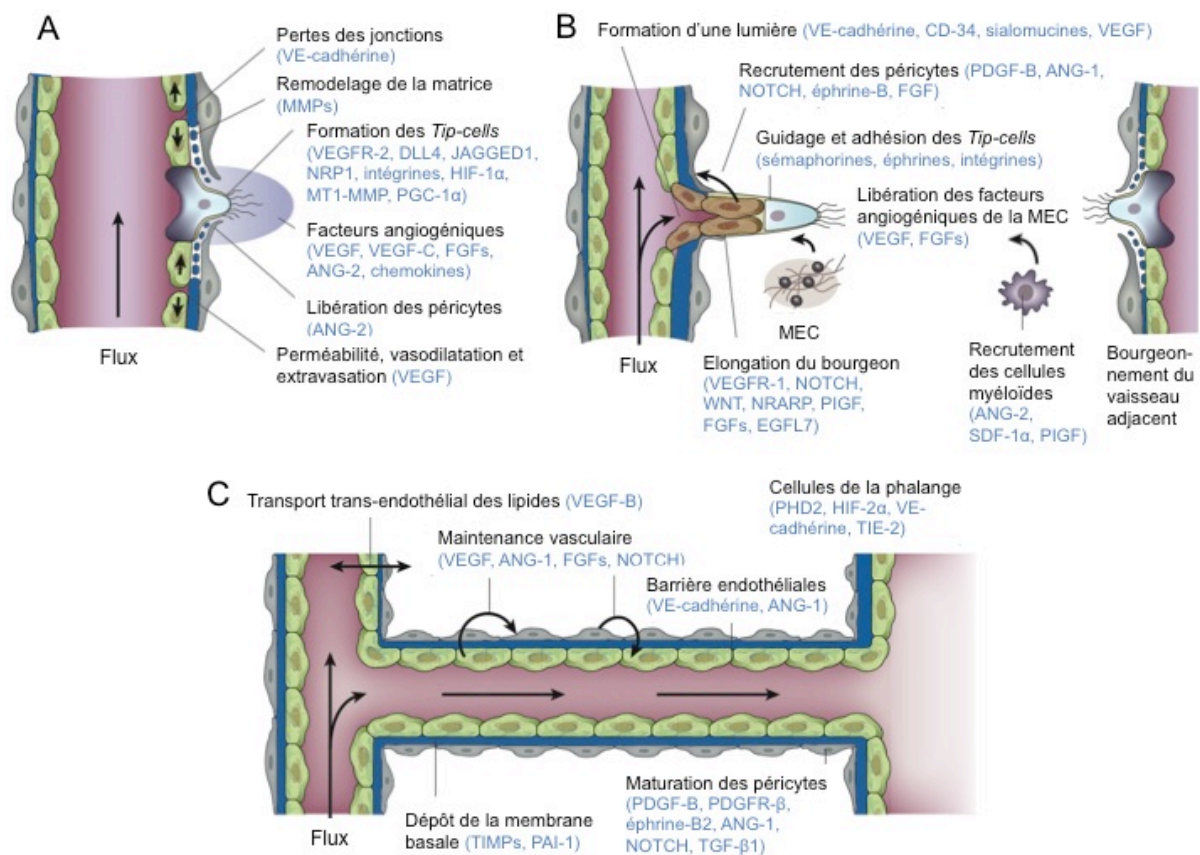


Figure 11 Les principales étapes de l'angiogenèse (avec les facteurs clés impliqués entre parenthèses). **A** Après stimulation par des facteurs angiogéniques, le vaisseau se dilate et une cellule endothéliale est sélectionnée pour devenir la *Tip-cell*. La membrane basale est détruite et il y a extravasation de protéines plasmatiques qui forment une MEC provisoire. **B** La *Tip-cell* répond aux signaux de guidage et migre dans la MEC. Les cellules voisines prolifèrent en la suivant puis se creusent d'une lumière : le bourgeon ou tige vasculaire s'allonge. Les péricytes sont recrutés et il y a un dépôt d'une nouvelle membrane basale afin de stabiliser le vaisseau. **C** La fusion du vaisseau néo-formé avec un voisin et la création d'une continuité entre les deux lumières permettent la perfusion du vaisseau qui devient alors quiescent. Il y a promotion d'un phénotype de type phalange avec ré-établissement des jonctions cellulaires, dépôt de la membrane basale, maturation des péricytes et production des signaux de maintenance vasculaire. D'autres signaux promeuvent le transport trans-endothélial des lipides. Adapté d'après Carmeliet et al., Nature 2011.

Premièrement, les péricytes se détachent de la paroi vasculaire (en réponse à ANG-2) et, grâce à une dégradation protéolytique médiée par les MMPs (métalloprotéases matricielles), se libèrent de la membrane basale (Figure 11A). Les cellules endothéliales perdent alors leurs jonctions et le vaisseau se dilate. Le VEGF augmente la perméabilité

entre les cellules endothéliales, ce qui est à l'origine d'une extravasation de protéines plasmatiques (tels que le fibrinogène et la fibronectine) qui forment une MEC (matrice extracellulaire) provisoire, permettant aux cellules endothéliales d'y migrer (via les intégrines). Des molécules angiogéniques, tels le VEGF et le FGF, sont libérées de la MEC grâce aux protéases et remodelent cette dernière en milieu « angio-compétant ». Une cellule endothéliale est alors sélectionnée pour devenir la *tip-cell* et servir de guide pour la formation du bourgeon angiogénique, en présence notamment des récepteurs au VEGF, des neuropilines (NRPs) et des ligands NOTCH (DLL4 et JAGGED1) (Figure 11A).

Par la suite, les cellules voisines de la *tip-cell* se divisent, afin d'allonger la tige de ce bourgeon (stimulées par NOTCH, NRARP (*NOTCH-regulated ankyrin repeat protein*), WNTs, PIGF (*placental growth factor*) et FGFs) et de créer une lumière vasculaire (grâce à la VE-cadhérine, au CD34, aux sialomucines, au VEGF et à *hedgehog*) (Figure 11B). Les *tip-cells* sont équipées de filopodes pour détecter des signaux de guidage environnementaux telles que les éphrines et sémaphorines, tandis que les cellules de la tige libèrent des molécules (telles que EGFL7) dans la MEC pour transmettre des informations sur la position spatiale de leurs voisines, de sorte que la tige s'allonge. Les cellules myéloïdes aident à la fusion de la tige angiogénique avec un autre vaisseau, permettant le passage du flux vasculaire. Pour qu'un vaisseau devienne fonctionnel, il doit devenir mature et stable. Les cellules endothéliales reprennent leur état de cellules de la phalange au repos et des signaux tels que PDGF-B (*Platelet-derived growth factor-B*), ANG-1, TGF- β (*transforming growth factor β*), éphrine-B2 et NOTCH sont à l'origine du recouvrement des cellules endothéliales par des péricytes (Figure 11C). Des inhibiteurs de protéases, connus sous le nom de TIMPs (*tissue metalloproteinase inhibitor*) et PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) sont à l'origine du dépôt de la membrane basale et les jonctions cellulaires sont rétablies afin d'assurer un flux vasculaire optimal. Par contre, les vaisseaux régressent s'ils ne peuvent être perfusés (Carmeliet 2011).

3.5.1.2.2. Ovaire et angiogenèse

L'angiogenèse est un phénomène physiologique indispensable dans l'ovaire fonctionnel. En effet, il s'agit d'un processus essentiel lors du cycle ovulatoire et de la maturation folliculaire.

Les 2 types d'angiogenèse ont été mis en évidence au niveau folliculaire. Tout d'abord l'angiogenèse par bourgeonnement, lors de la phase initiale du développement folliculaire, suivie de l'angiogenèse par intussusception au sein des follicules matures. Ce sont les besoins métaboliques qui régissent ces processus angiogéniques. En effet, la prolifération

initiale rapide des cellules de la thèque et de la granulosa est liée à la cooptation de vaisseaux interstitiels avec bourgeonnement de néo-vaisseaux afin de fournir les nutriments et les stimuli endocriniens extra-ovariens nécessaires. Dès que les follicules deviennent matures avec une activité endocrine sécrétoire, une angiogenèse par intussusception est alors requise afin de créer un réseau vasculaire sinusoidal capable de soutenir des besoins nutritionnels ainsi qu'une microcirculation fonctionnelle. La néo-artériole apparue près du follicule primaire se développe en un réseau concentrique tout autour du follicule en croissance jusqu'à former deux réseaux distincts, l'un au sein de la thèque interne et le second au niveau de la thèque externe, une fois le follicule devenu antral. Les artérioles et veinules situées au sein de la thèque externe envoient de fines extensions au niveau du plexus capillaire de la thèque interne, composé d'une seule couche de cellules endothéliales, juste à l'extérieur de la membrane basale. Ces capillaires ne pénètrent pas cette dernière et n'entrent pas au sein de la granulosa (Geva 2000). La formation de ce réseau vasculaire se poursuit et joue un rôle important dans la sélection du follicule dominant jusqu'à l'ovulation et la formation du corps jaune, alors qu'elle s'interrompt graduellement dans le pool de follicules atrétiques (Macchiarelli 2006). En pré-ovulatoire, la distribution de la vascularisation folliculaire se modifie avec majoration du flux vasculaire au niveau de la base du follicule au détriment de l'apex, ce qui facilitera l'ovulation (Acosta 2004). La membrane basale, séparant la thèque richement vascularisée de la granulosa, qui est relativement avasculaire, se rompt. Des fenestrations se développent au niveau des capillaires, qui vont rapidement bourgeonner et envahir la granulosa jusqu'à sa couche interne. Au moment de l'ovulation, la paroi folliculaire s'ouvre pour laisser éclore l'ovocyte. Les artérioles, veinules et vaisseaux lymphatiques forment alors un réseau capillaire complexe en étroite relation avec les cellules de la granulosa qui deviennent lutéales. La mise en place et le développement de ce réseau très complexe nécessitent une synchronisation parfaite et jouent un rôle essentiel dans la production stéroïdienne, notamment de progestérone (Geva 2000).

Tous ces phénomènes sont dépendants de nombreux acteurs : peptides vaso-actifs, gonadotrophines, stéroïdes tels que l'œstradiol et prostaglandines, dont les régulations sont fortement intriquées les unes aux autres (Trau 2015), mais dont les mécanismes exacts ne sont pas encore totalement élucidés. Parmi ces acteurs clés de l'angiogenèse ovarienne, le VEGF a un rôle déterminant dans la folliculogenèse et la survenue de l'ovulation. La concentration en VEGF au sein des cellules de la thèque et de la granulosa augmente lorsque le follicule devient sensible aux gonadotrophines (Otani 1999) et l'inhibition de celles-ci empêche l'expression de VEGF et l'angiogenèse en résultant. D'autres peptides interviennent également dans l'expression du VEGF folliculaire, tels que l'IGF-1 et -2

(*insuline-like growth factor* ou somatomédine C, de type 1 et 2) au sein des cellules de la granulosa ainsi que le système rénine-angiotensine avec notamment l'ANG-2 qui joue un rôle important dans l'angiogenèse du corps jaune débutant. Lorsque l'ovocyte n'est pas fécondé, le taux de VEGF diminue avec une majoration du ratio ANG-2/ANG-1, ce qui abouti à la détérioration vasculaire, typique de la lutéolyse, ANG-1 étant indispensable à la stabilisation de la paroi des vaisseaux (Yancopoulos 2000). Par contre, en cas de fécondation, le corps jaune est maintenu fonctionnel par la production d'hCG (hormone chorionique gonadotrope), qui promeut la survie des cellules endothéliales en augmentant notamment la sécrétion de VEGF et ANG-2 (Clapp 2009). Etant donné le rôle primordial du VEGF dans l'angiogenèse, en particulier au niveau ovarien, celui-ci sera détaillé dans la suite de ce manuscrit.

3.5.1.2.3. VEGF

Le VEGF est l'un des facteurs angiogéniques les plus importants, jouant un rôle clé dans la croissance et la différenciation des cellules endothéliales vasculaires. Dans ce manuscrit et tel que communément admis, le terme VEGF est utilisé pour décrire le VEGF-A, qui fait partie de la famille VEGF et est un régulateur important de l'angiogenèse. Son activité se reflète principalement en stimulant la survie, la prolifération, la migration ainsi que la différenciation des cellules endothéliales vasculaires, en modifiant leur expression génique et en retardant leur sénescence (Dvorak 2000). Le VEGF a également un rôle important dans la régulation de la perméabilité vasculaire, ce qui lui avait valu d'être dénommé « facteur de la perméabilité vasculaire » lors de sa découverte fin des années 1980 (Ferrara 1989, Dvorak 1999). Bien que son action soit principalement ciblée sur les cellules endothéliales, ses récepteurs ont également été décrits sur d'autres types tissulaires, tels que les cellules souches hématopoïétiques, les monocytes, les ostéoblastes et les neurones (Ferrara 2003).

La famille VEGF comporte 5 membres, les VEGF(-A), -B, -C et -D ainsi que le PlGF. Il est cependant à noter qu'un hétérodimère de VEGF-A et PlGF a également été décrit (DiSalvo 1995). Ces facteurs exercent leur rôle biologique en se liant aux récepteurs du VEGF, les VEGFR-1, -2 et -3 (Figure 12). Ces récepteurs sont composés de 7 domaines extracellulaires de type *Ig-like*, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique de type tyrosine-kinase (Tarallo 2015). Ces 3 récepteurs existent également sous formes solubles (sVEGFR-1, -2 et -3) qui sont générés par épissage alternatif. Ces récepteurs solubles sont composés uniquement des 6 premiers domaines extracellulaires de type *Ig-like* et représentent de puissantes molécules anti-angiogènes et anti-

lymphatiques endogènes (Lorquet 2010, Munaut 2012, Albuquerque 2013, Singh 2013). Ces effets inhibiteurs s'expliquent par la régulation des taux locaux et circulatoires des formes actives des membres de la famille VEGF par les récepteurs solubles, en les liant et les séquestrant avant qu'ils n'atteignent leurs récepteurs membranaires (De Falco 2002). Les VEGF-C et -D, se couplant au VEGFR-3, sont particulièrement impliqués dans la lymphangiogenèse. Le PIGF, protéine dont la structure est proche de celle du VEGF, intervient principalement dans l'angiogenèse pathologique. Ce dernier est en effet un ligand spécifique du VEGFR-1 dont l'activation est à l'origine du recrutement, au sein de sites inflammatoires néo-angiogéniques, de cellules murales, de cellules de inflammatoires ainsi que de cellules dérivées de la moelle osseuse (De Falco 2012, Tarallo 2015).

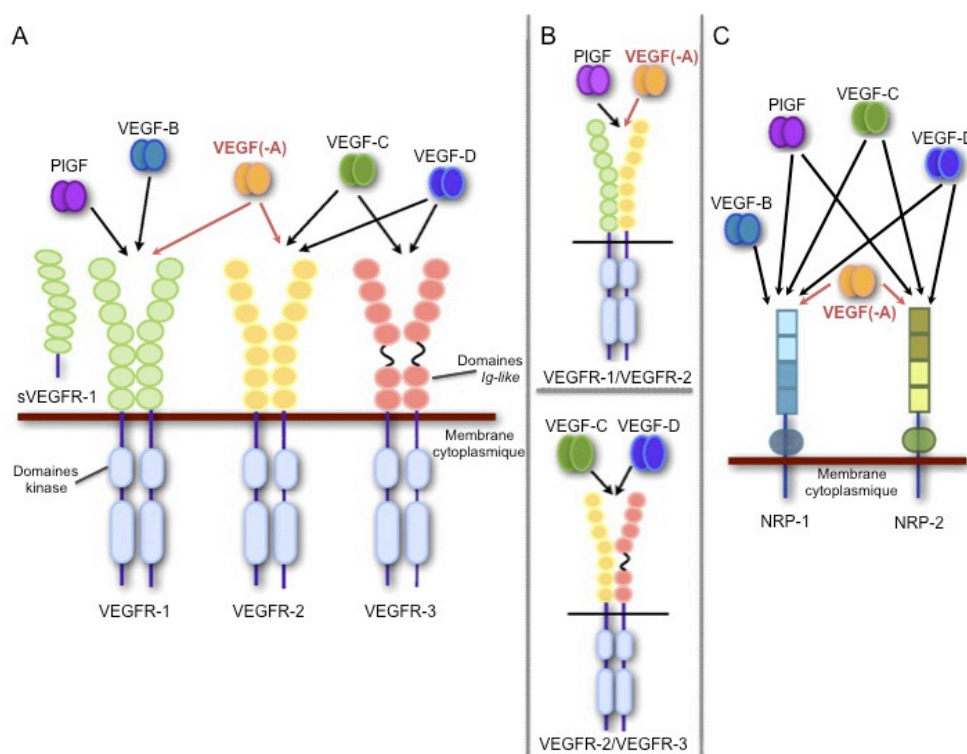


Figure 12 La famille du VEGF et ses récepteurs. **A** La famille du VEGF comprend les VEGF-A (communément appelé VEGF), VEGF-B, -C, -D et le PIGF. Le VEGF se lie au VEGFR-1 et -2 tandis que le PIGF et le VEGF-B se lient uniquement au VEGFR-1. Les VEGF-C et -D quant à eux se lient aux VEGFR-2 et -3. **B** VEGF et PIGF peuvent également se lier à des complexes de récepteurs hétérodimères formés de VEGFR-1 et -2. De même, VEGF-C et -D peuvent se lier à des hétérodimères composés de VEGFR-2 et -3. **C** NRP-1 et -2 peuvent jouer le rôle de corécepteurs pour certains complexes VEGF-VEGFR, moduler l'activation du VEGFR et sa signalisation. Les différents membres de la famille VEGF se lient aussi bien à NRP-1 que -2 sauf le VEGF-B qui se lie uniquement à NRP-1. Adapté d'après Ruiz de Almodovar et al., *Physio Rev* 2009.

Le VEGF-B qui représente un autre ligand spécifique du VEGFR-1, intervient peu dans l'angiogenèse mais joue un rôle dans l'apport en acides gras des cellules endothéliales (Hagberg 2010). L'activation d'un même récepteur, le VEGFR-1, peut se réaliser de différentes manières en fonction du ligand impliqué (VEGF, PIGF ou VEGF-B), ce qui

explique les effets variables de ces différents membres de la famille VEGF (Roskoski 2008). Ces différentes fonctions expliquent que seul le VEGF(-A) sera détaillé dans ce manuscrit.

Le VEGF est une glycoprotéine de 34 à 45 kD, codée par un gène situé sur le chromosome 6p21.3. Il se compose de 2 monomères qui s'associent en « tête-bêche », *via* un pont disulfure, en homodimère. Grâce à cette orientation des monomères, les homodimères VEGF-VEGF présentent des sites de liaison pour leurs 2 récepteurs, VEGFR-1 et -2. C'est par l'intermédiaire de sa liaison au VEGFR-2 que le VEGF exerce la plupart de ses effets angiogéniques, le VEGFR-1 ayant plutôt un rôle dans l'angiogenèse pathologique, comme décrit ci-dessus. Cependant, l'expression du VEGFR-2 peut également être majorée dans certaines circonstances pathologiques telle que le cancer (Youssefian 2007, Smith 2010). L'affinité du VEGF pour le VEGFR-2 est améliorée par la NRP-1, un corécepteur qui n'est pas de type kinase (Mineur 2007). Elle est un corécepteur des VEGFR-1 et -2 alors que la NRP-2 est plutôt associée à VEGFR-3 (Tugues 2011).

Le VEGF, composé de 8 exons, est à l'origine de nombreuses isoformes par épissage alternatif, qui diffèrent majoritairement par la présence ou l'absence de séquences codées par les exons 6 et 7 (Figure 13). L'exon 1 ainsi qu'une petite partie du 2 (4 acides aminés) composent le peptide signal. Les sites d'interactions aux récepteurs du VEGF sont situés au niveau des exons 3 (VEGFR-1) et 4 (VEGFR-2). Les exons 6 et 7 permettent l'encrage à la MEC, par l'intermédiaire de la liaison à l'héparine et aux protéoglycans à héparane sulfate. Le site de liaison à NRP-1, contrairement à ce qui était pensé préalablement (Robinson 2001, von Wronski 2006, Tugues 2011), est codé par l'exon 8. Cependant, cette liaison nécessite également un couplage avec l'héparine, possible grâce aux sites de liaison codés par l'exon 7 (Vander Kooi 2007). L'exon 5 quant à lui code pour un site de clivage par la plasmine et les MMPs.

Parmi les nombreuses isoformes, les VEGF₁₂₁, ₁₆₅ et ₁₈₉ sont les plus couramment rencontrés. Le VEGF₁₂₁, ne possédant pas les exons 6 et 7, diffuse parfaitement alors que le VEGF₁₈₉, contenant les exons 6a, 7a et 7b, reste associé à la surface cellulaire et à la MEC. Le VEGF₁₆₅ quant à lui, contenant les exons 7a et 7b mais pas les exons 6a et 6b, possède des propriétés intermédiaires entre les isoformes 121 et 189, qui lui confèrent une biodisponibilité et une efficacité biologique optimales (Park 1993). Une isoforme du VEGF découverte plus récemment, le VEGF₁₁₁, ressemble à l'isoforme 121 et est donc parfaitement diffusible mais il a la particularité de ne pas posséder l'exon 5 et d'être par conséquent résistant à la protéolyse. Cette isoforme n'est pas présente de façon physiologique mais sa production est induite par des facteurs toxiques, tels que les rayons

ultraviolets de type B et certaines molécules génotoxiques (Mineur 2007).

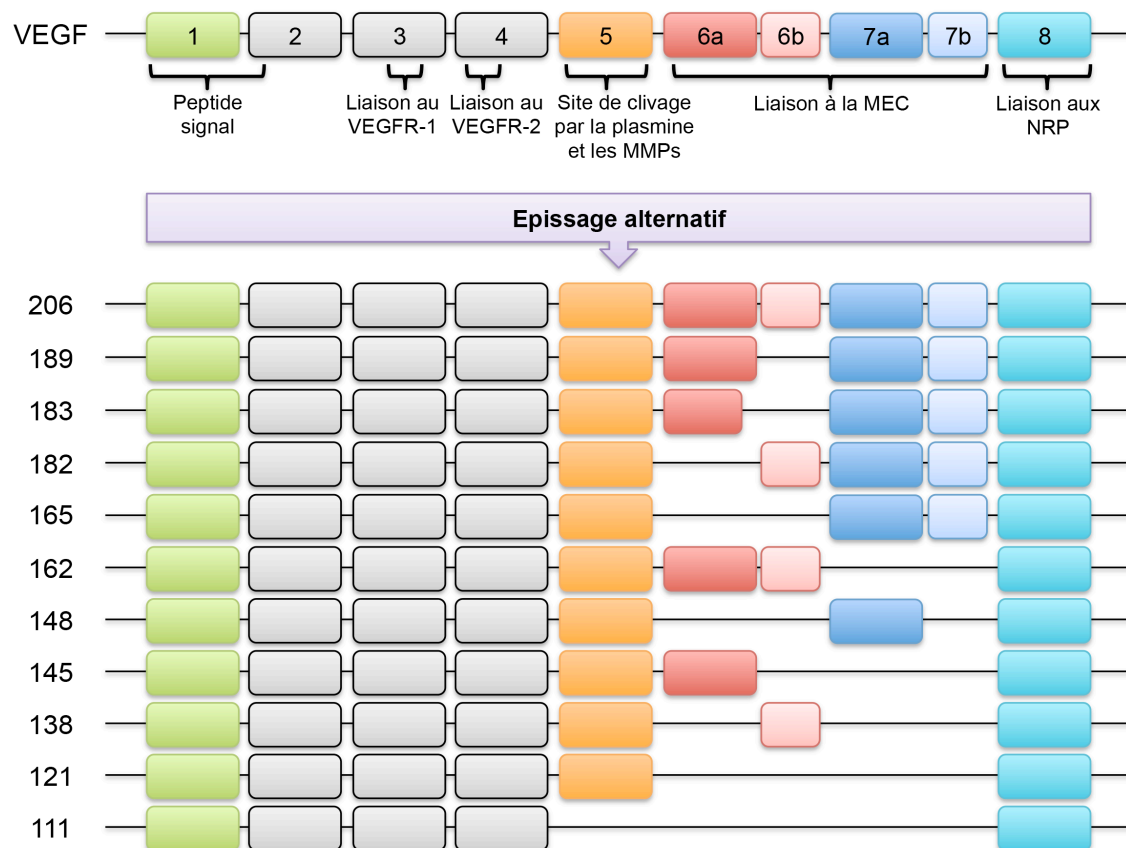


Figure 13 Le VEGF et ses isoformes. Le VEGF est composé de 8 exons lui conférant ses différentes propriétés. Par épissage alternatif, différentes isoformes sont créées, dont les principales sont représentées ici. Le nom de l'isoforme est un chiffre, représentant le nombre d'acides aminés la composant.

L'expression du VEGF est médiée par de nombreux stimuli qui agissent tout au long de sa production et de sa sécrétion. Parmi ceux-ci, citons le PDGF, le TNF- α (*tumor-necrosis-factor- α*), le TGF (α et β), l'IL(interleukine)-1, l'IL-6, l'IGF-1 ou encore le TGF- β 1 (Robinson 2001, Pages 2005). L'hypoxie est un puissant stimulus responsable de l'expression du VEGF, à l'origine de l'angiogenèse au sein des tissus hypoxiques, et ce *via* l'activation de HIF-1. En effet, l'HIF-1 α , constituant une des deux sous-unités de l'HIF avec HIF-1 β , est étroitement régulé par la pO_2 (Ruiz de Almodovar 2009). Cependant, HIF-1 est également activé dans d'autres conditions de stress tel que par un pH acide, de nombreuses cytokines et facteurs de croissance (Pages 2005). L'hypoxie est également à l'origine d'une prolongation de la demi-vie de l'ARNm du VEGF, qui est intrinsèquement fort labile (Levy 1996, Robinson 2001).

Les hormones féminines jouent également un rôle dans l'expression du VEGF. L'œstradiol et la progestérone induisent la transcription du VEGF par l'intermédiaire de leurs récepteurs (Pages 2005). Les gonadotrophines participent également à la régulation du

VEGF, puisqu'en activant les récepteurs FSH et LH/hCG, elles sont à l'origine d'une augmentation du taux d'ARNm du VEGF au sein des cellules de la granulosa. Cet accroissement, lié aux pics de LH et FSH de mi-cycle, est nécessaire au développement du réseau vasculaire entourant le futur corps jaune. Les prostaglandines participent également à l'augmentation de ce taux d'ARNm (Geva 2000).

Comme décrit ci-dessus, le VEGF exerce un rôle crucial dans l'angiogenèse indispensable à la maturation folliculaire. Il a par ailleurs été démontré que sa supplémentation chez des rats augmentait le nombre de follicules primaires et secondaires (Danforth 2003). D'autre part, le VEGF est également indispensable à la maintenance du pool de follicules primordiaux, puisque son inhibition chez la souris entraîne une diminution rapide de cette réserve (Roberts 2007). Ceci a été confirmé par la détection du VEGF (isoformes 121, 165 et 189) ainsi que ses récepteurs (VEGFR-1 et -2) au sein des cellules de la granulosa des follicules primordiaux humains (Abir 2010).

3.5.2. Perte folliculaire par apoptose

3.5.2.1. Apoptose liée à la cryopréservation et à la transplantation

La perte folliculaire, liée à l'hypoxie lors de la transplantation de tissu ovarien, est en partie liée à l'activation de l'apoptose. En effet, celle-ci a été objectivée pour la première fois après l'allogreffe d'ovaires de souris (Liu 2002). Cette étude a mis en évidence que l'apoptose est majoritairement située au sein des cellules de la granulosa et du stroma, et non au niveau ovocytaire. En effet, ces derniers sont métaboliquement moins actifs et donc plus résistants. Cependant, la survie folliculaire étant fortement dépendante de la qualité des cellules de la granulosa et du stroma avoisinant, une activation de l'apoptose au sein de ces cellules expliquerait la perte folliculaire observée lors de la cryopréservation ovarienne. Il a aussi été démontré que la densité vasculaire au sein du tissu greffé était inversement proportionnelle au pourcentage de tissu hypoxique ainsi qu'au nombre de follicules en apoptose (Soleimani 2011).

Bien que la cause la plus importante de la perte folliculaire observée après cryopréservation et transplantation de tissu ovarien soit liée à l'hypoxie lors de la transplantation ovarienne, la congélation est également à l'origine d'une diminution du pool de follicules primordiaux (Liu 2002, Rimon 2005). En effet, la congélation cellulaire et tissulaire peut entraîner un déclenchement de l'apoptose, notamment *via* l'activation de la caspase 3 (Stroh 2002).

3.5.2.2. Apoptose

3.5.2.2.1. Généralités

L'apoptose correspond à un phénomène physiologique de mort cellulaire programmée qui a été décrit pour la première fois il y a plus de 40 ans (Kerr 1972). Ce programme génétique est nécessaire pour le développement embryonnaire normal et la maintenance de l'homéostasie tissulaire ainsi qu'un système immunitaire adéquat (Adams 2003). Il est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Sa perturbation est impliquée dans de nombreux phénomènes pathologiques. Une apoptose insuffisante est observée dans les cancers ou les maladies auto-immunes alors qu'une mort cellulaire accélérée est observée dans les maladies dégénératives, l'immunodéficience et dans certaines formes d'infertilité (MacFarlane 2004). La différence majeure entre l'apoptose et la nécrose, un autre type de mort cellulaire, est l'inflammation : majeure dans la nécrose et absente dans l'apoptose.

Cette destruction cellulaire est coordonnée de l'intérieur même de la cellule par la famille des caspases qui sont des protéases à cystéine. Deux voies principales induisent l'activation de ces dernières, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 14).

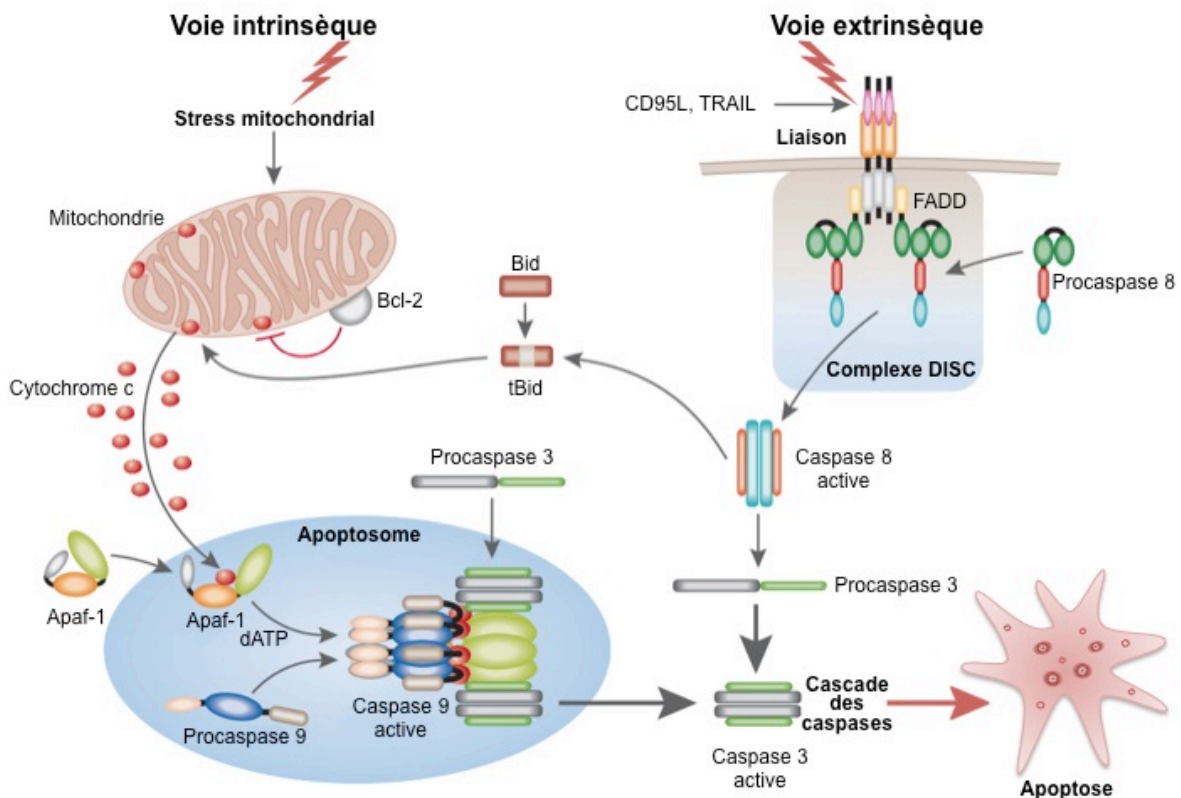


Figure 14 Voies principales d'activation de l'apoptose. Les deux voies principales d'activation de la cascade des caspases aboutissant à l'apoptose sont représentées, avec la voie intrinsèque (via des stimuli stressants) et la voie extrinsèque (via les « récepteurs de la mort »). Toutes deux aboutissent à l'activation de la caspase 3 qui est à l'origine de la cascade des caspases et à l'apoptose cellulaire. Adapté d'après MacFarlane et al., *EMBO reports* 2004.

La voie intrinsèque est activée en cas de stress mitochondrial, induit par certains produits chimiques ou par privation en facteurs de croissance, *via* le relargage de certaines protéines, tels que le cytochrome c. La libération de ce cytochrome est régulée par la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), comprenant des membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl1) et pro-apoptotiques (Bax, Bak et tBid) qui inhibent ou promeuvent cette libération. Une fois ce dernier relâché, il se lie à Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) pour former, avec la caspase 9 et en présence de dATP (désoxyadénosine triphosphate), l'apoptosome. Ce complexe est à l'origine de l'activation de la caspase 3 puis de la cascade des caspases aboutissant à l'apoptose cellulaire. Bien que la libération du cytochrome c soit cruciale pour l'activation des caspases, d'autres molécules pro-apoptotiques sont libérées de l'espace inter-membranaire mitochondrial, tels que l'AIF (*apoptosis-inducing factor*), Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct IAP-Binding protein with Low PI*) ou OMI/HtrA2, une protéase de type sérine (Adams 2003, MacFarlane 2004).

La voie extrinsèque implique des récepteurs membranaires, communément appelés les « récepteurs de la mort », qui font partie de la superfamille des récepteurs au TNF. Parmi ceux-ci, citons le TNF-R1, le CD95 ainsi que les TRAIL-R1 et -R2 (récepteurs du *TNF related apoptosis inducing ligand*). La fixation d'un ligand sur ces récepteurs est à l'origine d'une activation rapide de la caspase 8, initiatrice d'apoptose et recrutée via la formation d'un complexe récepteur-ligand trimérisé, connu sous le nom de DISC (*death-inducing signaling complex*). La formation de ce complexe est possible grâce à la protéine adaptatrice FADD (*Fas (apoptosis stimulating fragment)-associated protein with death domain*) qui fait le lien entre le récepteur et la caspase initiatrice. L'activation de la caspase 8 est à l'origine de l'activation de la caspase 3 puis de toute la cascade des caspases aboutissant à l'apoptose (Adams 2003, MacFarlane 2004).

La famille des caspases est composée d'une douzaine de membres dont la plupart ont un rôle dans l'activation de l'apoptose. Ces caspases pro-apoptotiques sont réparties en deux groupes, les caspases initiatrices (caspases 8, 9 et 10) et les effectrices (caspases 3, 6, 7). La caspase 2, quant à elle, possède des caractéristiques propres aux deux groupes (Pop 2009). Parmi les caspases effectrices, la caspase 3 est considérée comme la plus importante et peut-être activée par les différentes caspases initiatrices. Une fois activée, elle clive l'ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*) en CAD (*Caspase Activated DNase*). Ce dernier dégrade l'ADN et est à l'origine d'une condensation de la chromatine. La caspase 3 est également à l'origine d'une réorganisation du cytosquelette de la cellule en corps apoptotiques, qui seront alors phagocytés par les macrophages voisins (Elmore 2007). Dans le cadre de nos recherches, nous avons été amenés à utiliser un inhibiteur pan-

caspase, le Z-VAD-FMK (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluorométhylketone) qui est connu pour inhiber l'apoptose en se fixant de façon réversible sur les sites catalytiques des caspases 3, 8 et 9 (Men 2006).

La famille des sphingolipides joue également un rôle important dans la régulation de l'apoptose, bien que tous les mécanismes ne soient pas encore élucidés (Figure 15). En effet, ces lipides bioactifs ont un rôle soit pro-apoptotique, par exemple pour la céramide et la sphingosine, soit anti-apoptotique pour la sphingosine-1-phosphate (S1P).

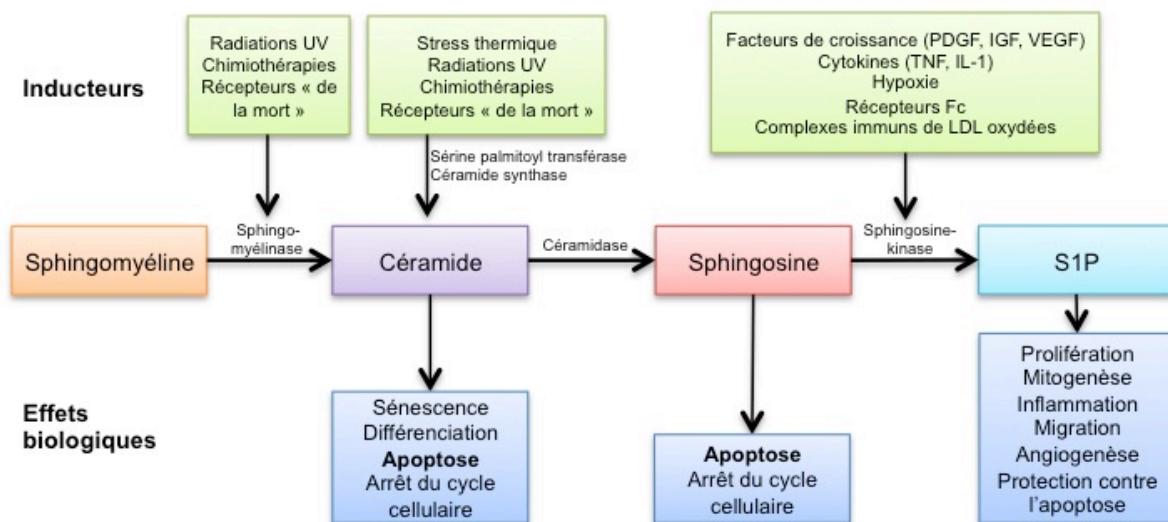


Figure 15 Rôles des sphingolipides (céramide, sphingosine et S1P) dans la biologie cellulaire. La céramide peut être générée à partir de la sphingosine par la sphingomyélinase ou être synthétisée *de novo* par la sérine palmitoyltransférase ou la céramide synthase. La sphingosine et la S1P peuvent être générées par la céramidase et la sphingosine kinase. Ces métabolites, interconnectés, interagissent avec leurs protéines cibles pour aboutir à leurs effets biologiques dont les plus importants sont d'être pro-apoptotique pour la céramide et la sphingosine et au contraire anti-apoptotique et même pro-angiogène pour la S1P. Adapté d'après Hannun *et al.*, *Nature Review* 2008.

La céramide est un lipide composé de molécules neutres hydrophobes, à l'origine d'une localisation préférentielle au niveau de son site de formation bien qu'elle puisse assez facilement traverser la membrane. En comparaison, la sphingosine et la S1P sont composées d'une seule chaîne de lipide avec une solubilité aqueuse suffisante pour se déplacer rapidement entre les membranes afin de s'équilibrer de part et d'autre. Au niveau physiologique, la S1P est présente en faible quantité au niveau intracellulaire et a une forte affinité pour ses récepteurs, S1PR-1 à -5 qui sont des récepteurs couplés à la protéine-G (Rosen 2005), alors que la céramide est présente en quantité plus abondante mais a une affinité plus faible pour ses récepteurs. Les différentes voies de signalisation de ces lipides bioactifs sont encore loin d'être totalement éclaircies mais il a été démontré qu'en cas de stimuli pro-apoptotiques, une synthèse accrue de céramide est déclenchée, par l'intermédiaire du système Fas, ce qui fait pencher la balance des facteurs pro- et anti-

apoptotique du côté pro-apoptotique avec l'activation de la caspase 9 (Hannun 2008). La S1P, quant à elle, a une action anti-apoptotique en inhibant la caspase 3 (Nakahara 2012, Tsai 2013). Il a été récemment mis en évidence qu'outre ses effets anti-apoptotique et angiogénique, la S1P, qui est présente au niveau du fluide folliculaire (Becker 2011), intervient dans la croissance du follicule (Cheng 2015, Hernandez-Coronado 2015).

3.5.2.2. *Apoptose au niveau ovarien*

L'apoptose est un phénomène très important au niveau ovarien. C'est en effet par ce mécanisme que disparaissent les follicules en atresie ainsi que le corps jaune au moment de la lutéolyse. Lors de la vie fœtale, l'apoptose est localisée au niveau des ovocytes alors qu'à l'âge adulte, elle est plutôt détectée au niveau des cellules de la granulosa des follicules secondaires et antraux. Hypothétiquement, les mécanismes sous-jacents de cette atresie folliculaire massive comprennent d'une part un « contrôle qualité » avec élimination des anomalies liées à une méiose imparfaite et d'autre part un déficit de production des facteurs de survie folliculaire par les cellules voisines et enfin, un « autosacrifice » ou une « mort altruiste » en faveur des follicules voisins (Hussein 2005). Il faut souligner que l'ADN mitochondrial est plus susceptible de subir des mutations que l'ADN génomique. Par conséquent, la qualité des mitochondries joue un rôle primordial dans la survie de l'ovocyte ou son atresie. La déplétion folliculaire liée aux traitements anti-cancéreux est également liée à l'apoptose (Morita 2000).

Tous ces phénomènes sont extrêmement complexes et font intervenir une multitude de molécules. Celles-ci peuvent être réparties en 4 classes (Hussein 2005) :

- les molécules impliquées dans la survie folliculaire, telles que Bcl-2, TGF- β , c-KIT, NOBOX, BMP, des intégrines et la GnRH ;
- les molécules impliquées dans l'atresie folliculaire, avec entre autre Fas, les caspases, TNF, p53 et IFN (interféron) ;
- les molécules impliquées dans la sélection folliculaire, dont Bcl-2, Bax, FSH, inhibine, Fas ligand et les caspases ;
- les molécules impliquées dans la lutéogenèse, telles que Fas/Fas ligand, caspase 3, Bax, BMP (ligands et récepteurs) et PGF2 (prostaglandine F2).

3.5.3. Activation folliculaire

Un autre phénomène à l'origine d'une perte folliculaire après cryopréservation et auto-transplantation de cortex ovarien a été mis en évidence : l'activation folliculaire massive.

Celle-ci est liée à des taux de recrutement et de développement des follicules primordiaux accélérés, et est observée jusqu'à environ 140 jours après la transplantation chez la brebis, lorsque les cycles redeviennent ovulatoires (Baird 2004). Il a d'ailleurs été mis en évidence une désynchronisation de développement entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa des follicules secondaires après cryopréservation et xéno-transplantation de tissu humain (Nottola 2008), signe d'un développement folliculaire anormal. Une fois initié, le développement du follicule primordial se poursuit soit jusqu'à l'ovulation, pour un faible nombre de follicules, soit jusqu'à disparition par atrophie, ce qui explique que l'activation massive observée après la cryopréservation ovarienne est à l'origine d'une déplétion folliculaire importante.

Cette activation folliculaire est multifactorielle avec notamment la participation de l'hypoxie présente lors des premiers jours de la greffe qui interférerait avec la voie du Kit-ligand intervenant dans la croissance et la survie folliculaire (David 2012). Un autre facteur participant à l'activation folliculaire est le manque d'AMH. Cette hormone, qui inhibe le recrutement des follicules primordiaux, est produite par les follicules en croissance, du follicule primaire jusqu'au début du stade antral (van Rooij 2002, Visser 2005), mais ceux-ci ne survivent pas à la cryopréservation, ce qui explique la chute du taux d'AMH après réimplantation des fragments de cortex ovarien cryopréservés (David 2012). Ce taux bas d'AMH après la transplantation est donc à l'origine d'un recrutement folliculaire massif. Il a également été démontré que cette activation folliculaire est plus importante après transplantation de tissu préalablement cryopréservé que lors de la greffe de tissu frais (Gavish 2014). Certains ont postulé un rôle possible de la fibrose tissulaire, retrouvée après greffe de tissu ovarien, sur l'activation folliculaire (Woodruff 2011). Il a également été mis en évidence que la simple fragmentation du tissu ovarien, telle que réalisée préalablement à la congélation, est à l'origine d'une activation folliculaire, liée à la perturbation de la voie de signalisation Hippo, qui intervient dans la régulation de la croissance au cours du développement (Kawamura 2013, Hsueh 2015).

3.5.4. Durée de vie fonctionnelle du greffon

Comme décrit ci-dessus, la cryopréservation suivie de l'autotransplantation de fragments de cortex ovarien est à l'origine d'une déplétion folliculaire importante via l'apoptose et l'activation folliculaire. Cette perte est estimée à 60 voire 95 % de la réserve folliculaire et s'accompagne de la disparition complète des follicules en croissance (Aubard 1999, Baird 1999, Aubard 2003, Liu 2008). Cette chute importante de la réserve folliculaire, ainsi que la petite taille et la restriction du nombre de fragments réimplantés, expliquent la

durée de vie fonctionnelle limitée du greffon. Malgré la restauration de cycles menstruels réguliers, le taux de FSH basal reste élevé, reflétant une faible réserve ovarienne et contribuant à une mauvaise qualité ovocytaire (Demeestere 2009).

Les données publiées manquent cruellement mais l'analyse de celles qui l'ont été a mis en évidence que la résurgence de l'IOP survient déjà 6 mois après la transplantation chez 22% des patientes (étude de 23 patientes) (Bedaiwy 2008). Une étude allemande sur 20 réimplantations a observé une durée de vie moyenne du greffon de 1,7 ans (Dittrich 2015). Bien que la durée de vie du greffon soit limitée, elle peut être extrêmement variable d'une patiente à l'autre. Naturellement, celle-ci dépend de la richesse en follicules des fragments, elle-même liée à l'âge de la patiente au moment du prélèvement. Il a été observé, chez une jeune femme dont le prélèvement avait été réalisé avant l'âge de 22 ans, une restauration de l'activité ovarienne pendant plus de 5 ans (Donnez 2015). Il a également été observé qu'une seule greffe pouvait être à l'origine de deux naissances, la seconde étant survenue 3 ans après la réimplantation des fragments (Demeestere 2010).

3.6. Risques de la cryopréservation ovarienne

Parmi les risques liés à la cryopréservation ovarienne, il y a tout d'abord ceux dus à la procédure chirurgicale, qui sont communs à toute chirurgie pelvienne et ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

Le risque de réintroduire des cellules cancéreuses, ayant métastasés dans l'ovaire, lors de la réimplantation des fragments cryopréservés constitue le risque majeur de cette technique, bien que les données manquent sur la quantité de cellules cancéreuses nécessaire pour induire une rechute lorsqu'elles sont réensemencées avec les greffons ovariens après rémission complète de la maladie. Naturellement, le risque de métastase ovarienne est dépendant du type de cancer (Tableau 5) et, heureusement, peu de tumeurs malignes survenant chez des patientes en âge de procréer métastasent dans les gonades.

La première mesure à suivre afin de limiter ce risque de réensemencement de cellules cancéreuses est de réaliser une évaluation histologique complète à la recherche de micro-métastases. Celle-ci doit être effectuée sur plusieurs échantillons de tissu ovarien, avant et après la congélation, et ce, quelle que soit l'ampleur du risque de métastase ovarienne. En effet, des cellules cancéreuses ont été retrouvées au sein d'une biopsie ovarienne dans le cadre d'une cryopréservation pour lymphome de Hodgkin, pathologie préalablement réputée à faible risque de métastase ovarienne (Bittinger 2011). Une imagerie pré-opératoire afin

d'exclure une dissémination ovarienne macroscopique de la maladie est également un prérequis intéressant à la réalisation de la cryopréservation (Meirow 2008).

Tableau 5 Risque de métastase ovarienne en fonction du type de cancer. Adapté d'après Dolmans et al., *Fertility and Sterility*, 2013.

Risque faible	Risque modéré	Haut risque
Tumeur de Wilms	Cancer du colon	Leucémie
Carcinome ostéogénique	Adénocarcinome du col utérin	Neuroblastome
Cancer du sein de stade 1 à 3 et de type canalaire	Cancer du sein de stade 4 ou de type lobulaire	Lymphome de Burkitt
Lymphome Hodgkinien	Lymphome non-Hodgkinien	
Cancer cervical épidermoïde	Sarcome d'Ewing	
Rhabdomyosarcome non génital		

Des techniques de biologie moléculaire et d'immunohistochimie peuvent également être utilisées en complément, afin de dépister la présence de cellules cancéreuses non détectées lors de l'histologie classique. En effet, certaines études ont mis en évidence des RT-PCR (*reverse-transcribed polymerase chain reaction*) positives pour le transcrit BCR-ABL (gène de fusion entre BCR et ABL, typiquement retrouvé dans les leucémies myéloïdes chroniques) sur certains fragments histologiquement normaux de patientes leucémiques (Meirow 2008, Dolmans 2010, Rosendahl 2010, Greve 2012). Néanmoins, dans ces études, la greffe de ces fragments positifs en RT-PCR chez des souris immunodéprimées pendant plusieurs mois n'a pas été à l'origine d'une récurrence tumorale (Dolmans 2010, Greve 2012). Malheureusement, la détection de ces marqueurs moléculaires spécifiques n'est disponible que pour certains types de cancers, surtout pour les leucémies myéloïdes chroniques avec BCR-ABL, bien que d'autres marqueurs soient en cours d'évaluation, par exemple en cas de cancer du sein (Bockstaele 2015, Hoekman 2015).

En cas de pathologie à haut risque de métastase ovarienne, telles que les leucémies, neuroblastomes et lymphome de Burkitt (Sonmezer 2004), la réimplantation des fragments est naturellement contre-indiquée. La cryopréservation doit néanmoins être proposée, car la patiente bénéficiera peut-être des progrès de la recherche, notamment dans la maturation ovocytaire *in vitro* à partir du cortex prélevé, lui permettant une restauration de sa fertilité sans risque de récurrence néoplasique.

Après revue de la littérature, les lymphomes non-Hodgkiniens ainsi que les sarcomes d'Ewing, préalablement considérés comme pathologies à faible risque de métastase ovarienne (Sonmezer 2004), ont été reclassés comme étant à risque modéré (Dolmans

2013). Cependant, la cryopréservation ovarienne suivie de réimplantation a été validée comme technique de préservation de la fertilité en cas de lymphome par l'ISFP (*International Society for Fertility Preservation*) (Kim 2012, Schmidt 2012).

La cryopréservation ovarienne suivie de la réimplantation des fragments de cortex peut donc être proposée, que la pathologie néoplasique soit à risque faible ou modéré de métastase ovarienne. Il est cependant indispensable que la décision de transplantation des fragments cryopréservés soit prise dans le cadre d'une discussion multidisciplinaire, faisant intervenir tant l'oncologue que le gynécologue, et après une évaluation la plus complète possible du risque de présence de cellules tumorales au sein de ces fragments. En toutes circonstances, la patiente doit être tenue informée du risque, si minime soit-il, de réimplantation de cellules tumorales.

3.7. Modèles expérimentaux

De part les limitations et les risques de la cryopréservation suivie de la transplantation ovarienne, explicités ci-dessus, de nombreuses équipes travaillent sur l'amélioration de ces procédures afin d'optimiser la recherche de cellules cancéreuses mais également de limiter l'hypoxie tissulaire et la déplétion folliculaire observées après la réimplantation des fragments. Nos recherches portant sur ces deux derniers axes, seuls les modèles expérimentaux s'y attendant seront discutés ci-après. Ceux-ci peuvent être divisés en 2 catégories selon qu'il y ait ou non transplantation.

3.7.1. Evaluation de la qualité tissulaire après cryopréservation

Actuellement, il existe 3 voies d'étude de la qualité du tissu lors de la cryopréservation ovarienne : la culture *in vitro*, la greffe sur CAM et la transplantation chez l'animal (auto- ou xéno-transplantation).

Suite à la cryopréservation, la culture de fragments de cortex ovarien est une approche intéressante pour évaluer l'état du tissu. Son analyse directement après la décongélation ne reflète, en effet, pas la qualité tissulaire réelle du fragment (Keros 2009, Maffei 2013, Sanfilippo 2013). Sa mise en culture permet donc d'évaluer sa reprise fonctionnelle, par exemple lorsque différents protocoles de congélation sont étudiés, sans faire intervenir la transplantation.

La greffe de fragments ovariens sur une CAM représente un modèle intermédiaire entre cette culture *in vitro* et la transplantation chez l'animal, qui a été utilisé par de rares

équipes (Martinez-Madrid 2009, Isachenko 2012). La MEC de la CAM étant comparable à celle du péritoine, elle a l'avantage de pouvoir étudier l'angiogenèse à l'origine de la revascularisation du transplant, lors des premiers jours post-transplantation, ce qui n'est pas possible en culture *in vitro*. Il s'agit d'une procédure assez simple dont les coûts sont inférieurs à ceux de la transplantation chez l'animal.

La transplantation de fragments après cryopréservation constitue le modèle expérimental idéal puisqu'il mime parfaitement la situation vécue en clinique. Comme il s'agit de modèles animaux, les coûts sont plus élevés que pour les approches précédentes et les protocoles plus lourds. La transplantation peut-être en auto- ou en xénogreffe, ce dernier signifiant la greffe d'un tissu d'une espèce sur une autre. L'avantage majeur de la technique de greffe est de pouvoir observer la reprise fonctionnelle du greffon à plus long terme, pouvant même aller jusqu'à l'ovulation, la fécondation voire la naissance de nouveau-nés à partir de follicules contenus dans le greffon, lorsqu'il s'agit d'une autogreffe. Des naissances ont été observées dans de nombreuses espèces. Il faut noter que la première naissance chez un grand mammifère eut lieu chez la brebis (Gosden 1994).

3.7.2. Modèles animaux

3.7.2.1. Généralités

En ce qui concerne les études préliminaires sur l'ovaire, notamment pour tout ce qui est cryopréservation de tissu gonadique, l'utilisation d'ovaire humain est limitée pour des raisons d'éthique et de disponibilité. Dès lors, de nombreuses espèces animales ont été utilisées pour pallier à ce manque.

L'utilisation d'un modèle murin est très fréquente dans l'étude de la cryopréservation ovarienne. Deux grands types de greffe sont alors possibles : soit la cryopréservation d'ovaires murins puis leur réimplantation chez la souris (autotransplantation) soit la xénogreffe de fragments ovariens de mammifères plus grands (tissu ovin voire humain) chez des souris immunodéprimées. Les souches de souris immunodéprimées les plus couramment employées sont les Nude, déficientes en lymphocytes T, et les SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*), déficientes en lymphocytes T et B. Ces différents modèles ont été utilisés par de très nombreuses équipes, dont la nôtre.

En ce qui concerne les mammifères plus grands, des ovaires de truies ont été utilisés et comparés aux ovaires humains mais ont montré une cryorésistance différente, rendant leur utilisation peu utile (Gandolfi 2006). Les ovaires bovins semblent être un modèle plus

intéressant avec plus de similitudes par rapport aux ovaires humains (Gandolfi 2006, Bols 2010). L'utilisation de tissu d'origine ovine est régulièrement proposée en raison de ses multiples ressemblances avec le tissu humain (Gosden 1994, Aubard 1999, Baird 1999, Amorim 2003, Baird 2004, Bordes 2005, Denschlag 2005, Faustino 2010, Massardier 2010, Milenkovic 2011), raison pour laquelle nous avons employé ce dernier dans nos recherches. Ces ressemblances entre les deux espèces sont discutées ci-dessous.

L'utilisation de primate, et plus particulièrement du babouin, est naturellement un modèle très intéressant mais, étant donné la difficulté que représente un tel modèle de par son coût et la rareté de ces animaux au sein des laboratoires, son emploi doit plutôt être réservée aux études précliniques (Nyachio 2013).

3.7.2.2. Modèle ovin : comparaison femme-brebis

3.7.2.2.1. Anatomie et histologie

D'un point de vue anatomique et histologique, l'appareil reproducteur des deux espèces est assez semblable. Tant chez la femme que chez la brebis, l'ovaire est un organe situé dans la cavité péritonéale. La plus grande différence anatomique est retrouvée non au niveau ovarien mais bien au niveau utérin puisque la fusion des deux cornes utérines présente chez la femme n'est pas retrouvée chez la brebis dont l'utérus est formé d'un corps et de deux cornes (Figure 16).

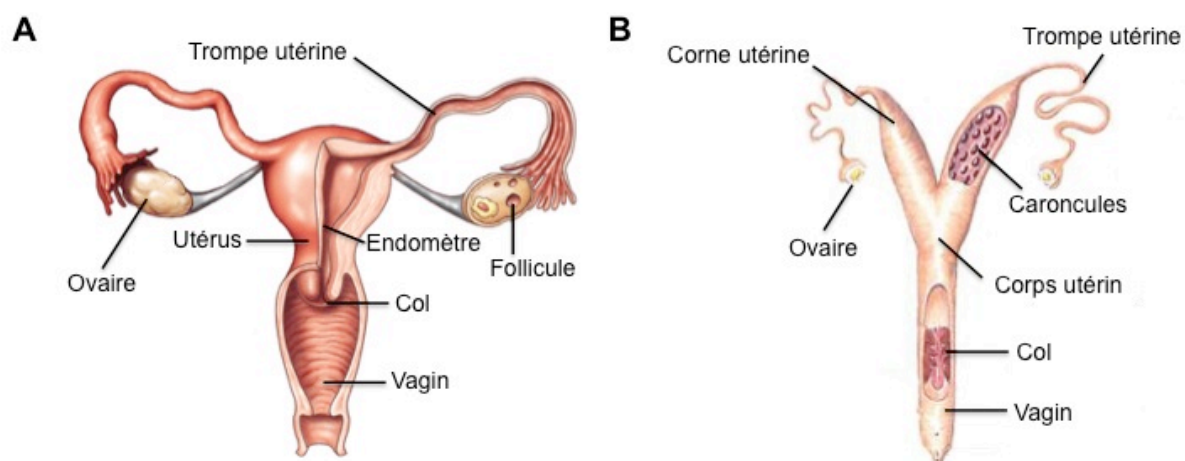


Figure 16 Appareil reproducteur de la femme (A) et de la brebis (B). A Chez la femme, les cornes utérines ont fusionné et la cavité utérine est recouverte d'une muqueuse, l'endomètre, dont la desquamation est à l'origine des menstruations. Adapté d'après <http://apps.cmsfq.edu.ec/biologyexploringlife/units/unit8/..%2F../text/chapter33/concept33.1.html> B Chez la brebis, on peut distinguer les deux cornes non fusionnées et la présence de caroncules au niveau de la surface de la cavité utérine, permettant l'attachement des membranes fœtales durant la gestation. Adapté d'après <http://www.esgpip.com/HandBook/Chapter5.html>

Quant aux ovaires, la différence n'est pas réellement retrouvée au niveau de l'anatomie mais plutôt au niveau de la taille puisque l'ovaire humain mesure 2 x 4 cm et pèse 10 à 15 gr alors que l'ovaire ovin mesure 1 x 2,5 cm et pèse environ 4 gr.

D'un point de vue histologique, l'architecture ovarienne est semblable entre les deux espèces avec la différenciation de l'organe en deux parties, la médullaire et le cortex (Figure 17). La médullaire est un tissu conjonctif qui compose le centre de l'ovaire, elle contient des cellules musculaires lisses, des fibres élastiques, des fibres de réticuline et surtout les vaisseaux et fibres nerveuses. Le cortex quant à lui est situé en périphérie et contient la réserve folliculaire ainsi que le stroma et est recouvert d'une couche épithéliale de type unistratifié (Kühnel 2003). De même, les masses corporelles de la femme et de la brebis sont assez proches, variant de 60 à 80 Kg.

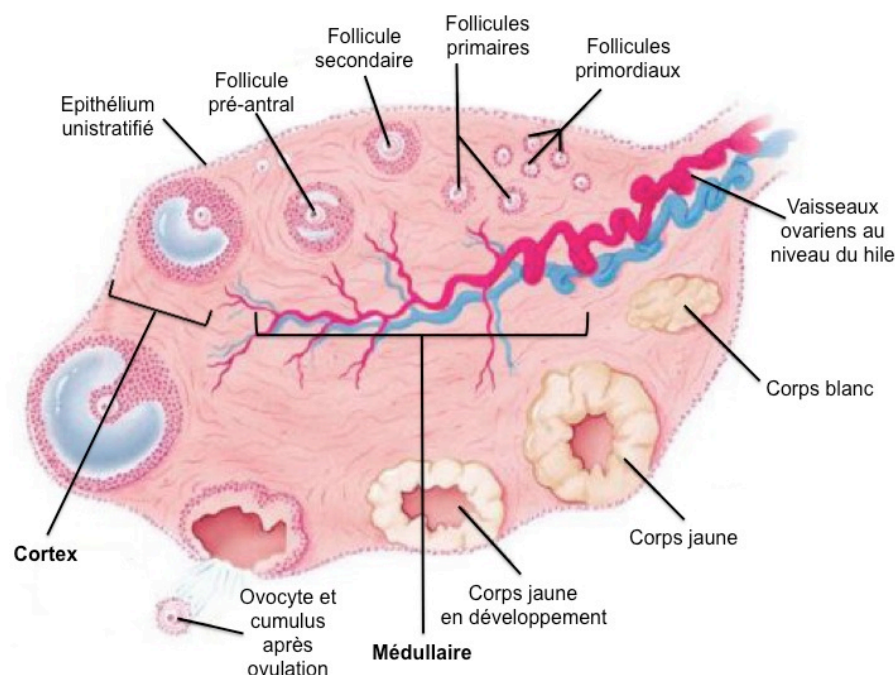


Figure 17 Représentation de l'anatomie ovarienne. La médullaire, située au centre de l'ovaire, contient les vaisseaux assurant l'irrigation alors que le cortex, situé en périphérie, contient la réserve folliculaire. Adapté d'après <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dico/d/biologie-ovaire-4134/>.

3.7.2.2.2. Cycles d'activité ovarienne

Le cycle d'activité ovarienne est caractérisé par la présence périodique soit d'un comportement d'œstrus soit de menstruations. L'œstrus, ou chaleur, correspond à la période où coïncide la fertilité, liée à l'ovulation, et une réceptivité vis-à-vis du mâle. L'ovulation a lieu au début du cycle d'œstrus chez la brebis et 14 jours avant le début des menstruations chez la femme. De nombreuses ressemblances existent entre les deux types

de cycle, notamment au niveau des mécanismes de rétrocontrôle hormonal sur les gonadotrophines hypophysaires. Les différences entre les deux types de cycles se reflètent principalement au niveau de la durée de la phase folliculaire et de l'absence, chez la brebis, de sécrétion d'œstradiol et d'inhibine par le corps jaune ainsi que de menstruation. Les différences entre la durée des cycles des deux espèces sont reprises dans le Tableau 6.

Les processus d'ovogenèse ainsi que de folliculogénèse sont également assez semblables entre les deux espèces. La différence de durée de la période folliculaire est liée à la dissemblance de la taille du follicule ovulatoire et à sa vitesse de croissance (Figure 18). En effet, le follicule ovulatoire contient plus de 50 millions de cellules de la granulosa chez la femme alors qu'il n'y en a que 3,5 millions chez la brebis. Le nombre de follicules présents à la naissance varie également puisqu'il y en a 1 à 2 millions chez la femme et seulement 160 000 chez l'agnelle. Les cycles menstruels débutent à la puberté chez la femme, soit vers l'âge de 11 ans, et entre 6 et 11 mois chez la brebis. La déplétion folliculaire accélérée après l'âge de 38 ans dans l'espèce humaine, comme décrite précédemment dans cet ouvrage, n'est par contre pas observée chez la brebis où il y a une stabilité du nombre de follicules antraux au cours de la vie. Ceci se reflète dans la persistance de cycles ovulatoires jusqu'à la fin de la vie de la brebis alors que ceux-ci s'arrêtent chez la femme à l'âge de la ménopause. Une similitude importante entre les deux espèces est qu'il s'agit de cycles mono-ovulatoires, bien que certaines races de brebis présentent des cycles poly-ovulatoires.

Il existe par contre chez la brebis une variation des cycles au cours de l'année avec une dépendance saisonnière se caractérisant par l'alternance d'une période anovulatoire et d'une saison de reproduction qui débute dès la diminution de la durée du jour. Il existe cependant quelques variations selon la race de la brebis (Thibault 2001).

Tableau 6 Caractéristiques des cycles chez la femme et la brebis. Adapté d'après *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, Thibault C. et Levasseur M.C., Editions Ellipses, 2001.

	Durée du cycle	Phase lutéale	Phase folliculaire	Durée de l'œstrus	Moment de l'ovulation
Femme	28 jours (24-35)	14 jours	14 jours (12-18)	/	J 14 (dans un cycle de 28 jours)
Brebis	17 jours (15-19)	15 jours (14-16)	2 jours (2-3)	24 h	18 - 36 h après le début des chaleurs

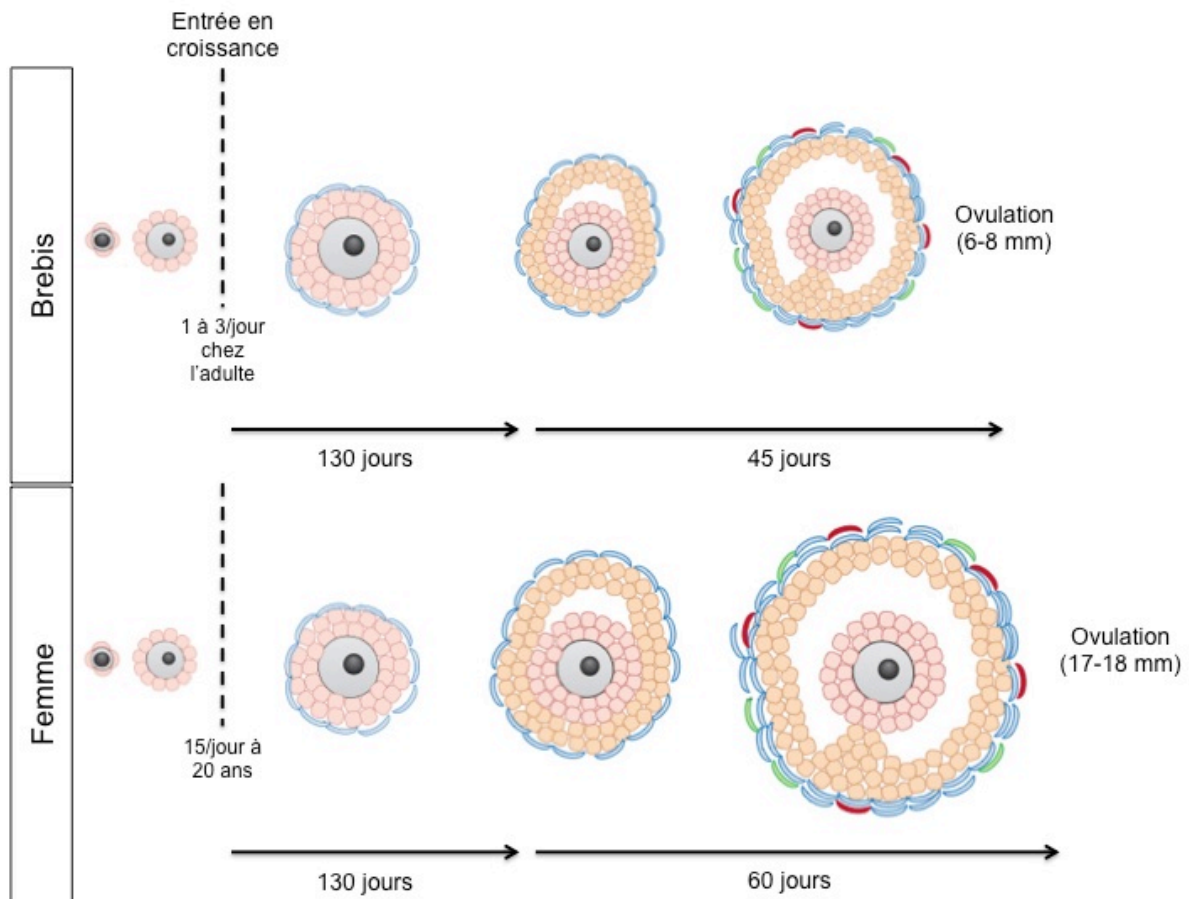


Figure 18 Comparaison de la folliculogénèse entre la femme et la brebis. Chez la brebis, 1 à 3 follicules par jour, en fonction de la race, quittent la réserve folliculaire et commencent à se développer contre 15 par jour chez la femme de 20 ans. La taille du follicule primordial est semblable entre les deux espèces, à savoir 35 μm. Par contre, celle du follicule ovulatoire varie en fonction du nombre de cellules de la granulosa et cette différence se reflète dans l'intervalle de temps nécessaire pour la maturation du follicule depuis l'apparition de l'antra jusqu'au stade pré-ovulatoire, respectivement de 45 et 60 jours chez la brebis et la femme. La taille lors de l'ovulation est de 6 à 8 mm chez la brebis et 17 à 18 mm pour la femme. Adapté d'après *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, Thibault C. et Levasseur M.C., Editions Ellipses, 2001.

