

Discussion

Les nombreux progrès obtenus ces dernières décennies dans le domaine de l'oncologie, tant en terme de prise en charge diagnostique que thérapeutique, ont permis une amélioration significative du pronostic vital des patients cancéreux. Néanmoins, cette augmentation de l'espérance de vie doit également s'accompagner d'une meilleure qualité de vie. Cependant, les traitements oncologiques, qu'il s'agisse de chirurgie, de radiothérapie ou de chimiothérapie, peuvent altérer cette dernière, notamment au niveau de la reproduction. En effet, certains traitements, lorsqu'ils sont administrés durant l'enfance ou la période reproductive, peuvent altérer la fertilité voire empêcher la patiente de mener à bien un projet parental futur. Par conséquent, de nombreux programmes de recherche se sont développés dans l'intérêt de la prise en charge de la fertilité. Les progrès réalisés en la matière ont conduit, dès 2006, la Société Américaine d'Oncologie Clinique (ASCO) à émettre des recommandations aux cliniciens sur la nécessité d'informer les patientes en âge de procréer des différentes techniques de préservation de leur fertilité (Lee 2006). Le service de Gynécologie-Obstétrique du CHR de la Citadelle (Université de Liège) a participé au projet *Family Hope*, un outil mettant à disposition des patientes, de leurs familles mais également des professionnels, des informations pratiques quant aux différentes options disponibles. A l'heure actuelle, ce site cible surtout la préservation de la fertilité en cas de néoplasie mammaire, mais devrait s'étendre à l'ensemble des pathologies par la suite (Annexe 2).

Parmi les différentes options envisageables pour la préservation de la fertilité, seules les cryopréservations d'embryons et d'ovocytes matures sont considérées comme des techniques validées et non expérimentales par la Société Américaine de Médecine de la Reproduction (ASRM). Cependant, nous ne pouvons proposer ces dernières à toutes les patientes puisqu'elles nécessitent une stimulation hormonale impossible chez les patientes pré-pubères et non réalisable en cas de délai court avant l'instauration des traitements oncologiques. Chez ces patientes, la cryopréservation de tissu ovarien est à ce jour l'unique technique envisageable. En effet, l'autotransplantation de tissu ovarien ne nécessite pas de stimulation hormonale au préalable, permet de débiter immédiatement les traitements anti-cancéreux, restaure la fonction ovarienne, tant endocrine que reproductive, et est réalisable chez les enfants ainsi qu'en cas de néoplasie hormono-dépendante. La cryopréservation de tissu ovarien est toujours considérée par beaucoup comme étant expérimentale, bien que plus de 60 naissances aient d'ores et déjà été décrites dans la littérature (Donnez 2015). Associée à cette procédure, une vitrification ovocytaire après MIV d'ovocytes antraux, prélevés extra-corporellement lors de la cryopréservation ovarienne, peut être réalisée et est à l'origine de quelques naissances (Prasath 2014, Segers 2015, Uzelac 2015).

Le but de nos recherches est d'améliorer la technique de la cryopréservation et de greffe ovarienne. En effet, lors du processus de cryopréservation de cortex ovarien et de sa réimplantation, une perte folliculaire massive est observée avec comme conséquence, entre autre, une durée de vie limitée du greffon. Cette déplétion folliculaire est liée à différents phénomènes. La première cause est directement associée à la technique de greffe, qui est avasculaire, et à la période d'hypoxie tissulaire qui en résulte. Celle-ci aboutit directement à une perte folliculaire par différents types de mort cellulaire, telle que l'apoptose. La première partie de nos recherches s'est portée sur l'amélioration de la revascularisation des greffons, grâce au VEGF (**Publications n° 1, 2 et 4**). L'apoptose cellulaire peut également être activée lors de la congélation du tissu et être à l'origine d'une perte folliculaire (Liu 2002, Stroh 2002, Rimon 2005). La lutte contre cette activation de l'apoptose constitue le deuxième axe de nos recherches (**Publications n° 5 et 6**). Le dernier phénomène important aboutissant à la perte folliculaire est l'activation folliculaire massive observée après la réimplantation. Celle-ci est attribuable à plusieurs facteurs tels que l'hypoxie post-transplantation ; le manque d'AMH lors de la greffe, lié au contexte d'IOP présent lors de la transplantation et à la perte des follicules en cours de maturation lors de la congélation (David 2012) ; et enfin, la fragmentation du cortex ovarien nécessaire à la congélation qui perturbe la voie de signalisation Hippo (Hsueh 2015).

Différentes approches sont étudiées dans la littérature afin de limiter l'hypoxie tissulaire, consécutive à la greffe avasculaire des fragments, et la déplétion folliculaire qui en résulte. Parmi ces approches, citons la greffe d'ovaire entier avec son pédicule vasculaire. Cette technique présente comme avantages un apport sanguin immédiat après la greffe avec une minimisation des lésions ischémiques et un allongement de la durée fonctionnelle du greffon. Toutefois, cette technique est grevée de nombreux inconvénients, tels que la difficulté technique de cryopréserver un ovaire entier, la complexité de la réanastomose vasculaire qui relève de la microchirurgie, une morbidité et une mortalité plus importantes de la procédure mais également un risque de lésions de reperfusion de l'organe, de phénomènes thromboemboliques et la possibilité de réintroduction accrue de cellules cancéreuses (Kim 2010). De nombreuses recherches ont été publiées (Torre 2012, Torre 2013, Nichols-Burns 2014, Isachenko 2015) ou sont en cours afin d'améliorer cette technique de cryopréservation d'ovaire entier mais il n'y a pas encore eu de naissance, chez l'humain, suite à un tel procédé.

La seconde voie de recherche contre l'hypoxie est l'accélération de la revascularisation du transplant après la greffe. Ceci a constitué le premier axe de nos recherches. Plusieurs molécules ont été étudiées dans la littérature, et ont démontré un effet

positif sur la revascularisation du greffon associée ou non à un impact sur la qualité et la densité folliculaire à plus long terme. L'érythropoïétine a un effet intéressant sur l'angiogenèse après greffe de tissu canin chez la souris, sans impact sur la densité folliculaire mais avec une amélioration de leur morphologie après 8 à 16 semaines de greffe (Commin 2012). Une étude plus récente a mis en évidence, dans un modèle murin, un effet bénéfique de l'activation d'Akt1, une protéine kinase impliquée dans l'angiogenèse, dans la revascularisation du greffon mais sans impact significatif sur la densité folliculaire (Cohen 2015).

Parmi les autres molécules étudiées, citons les gonadotrophines telles que l'HMG (ménotropine ou *human menopausal gonadotropin*) et la FSH. En effet, il a été observé que la culture d'ovaires murins dans un milieu contenant de l'HMG préalablement à la greffe permet une amélioration de la revascularisation, via une augmentation de la sécrétion de VEGF, ainsi que de la survie folliculaire (Wang 2012). L'utilisation de gonadotrophines en administration systémique dans un modèle d'autogreffe d'ovaires de rats n'a pu améliorer ni la revascularisation ni la survie folliculaire mais a cependant été associée à une sécrétion accrue de VEGF (Yang 2008). Beaucoup plus récemment, une autre équipe a par contre mis en évidence, un effet bénéfique de l'ajout de FSH dans le milieu de congélation d'ovaires murins sur l'angiogenèse, la réserve folliculaire et la fertilité des souris transplantées (Yang 2015). Un cas clinique a reporté la naissance d'un enfant après réimplantation de fragments ovariens ayant été traité par du PRP, un produit sanguin contenant un haut taux de plaquettes mais également une concentration importante en nombreux facteurs de croissance, tels que le PDGF, le TGF- β et le VEGF (Callejo 2013). Il n'y a cependant pas eu d'étude de la revascularisation du greffon ni de l'impact sur la densité ou la qualité folliculaire avec le PRP. Une étude récente a mis en évidence un effet positif sur la revascularisation des greffons du Setarud, un extrait de 3 plantes contenant plusieurs agents pharmacologiquement actifs, via une augmentation de la production de VEGF et d'ANG-2 (Hormozi 2015). Cependant, cette étude porte sur de petits échantillons et n'a pas étudié l'impact de cette drogue sur la préservation folliculaire.

Comme le VEGF joue un rôle déterminant dans la revascularisation des greffons, tel que démontré ci-dessus, nous avons décidé d'étudier les effets de 2 isoformes du VEGF, à savoir le 165 (**Publication n° 1**) et le 111 (**Publication n° 2**) dans un modèle de xéngreffe de tissu ovarien ovin chez la souris SCID. Dans notre modèle, l'agent angiogénique est administré localement, au niveau du site de greffe, puisqu'il est contenu dans une matrice de collagène enrobant le fragment greffé. Ce mode d'administration est très intéressant puisqu'il permet un relargage progressif du VEGF dans les heures et les premiers jours

suivant la transplantation. Ce type de traitement ne nécessite pas d'injections répétées au niveau du site de greffe, tel que cela a été réalisé dans diverses études (Schnorr 2002, Cha 2014), mais permet d'avoir une concentration maximale de l'agent pro-angiogène à l'endroit cible, tout en minimisant la diffusion systémique. En effet, cette dernière est tout à fait contre-indiquée dans le contexte clinique d'autotransplantation de fragments chez des patientes aux antécédents néoplasiques, même si elle a démontré un effet bénéfique sur le greffon, dans des études animales, lorsque le VEGF était administré en association avec du GCSF en intra-péritonéal (Skaznik-Wikiel 2011) ou à du bFGF en injections sous-cutanées (Wang 2013).

Plusieurs matrices ont déjà été utilisées comme système d'administration du VEGF, dans différents modèles de transplantation de multiples types cellulaires ou tissus, tels que l'alginate (Kedem 2005), la fibrine (Shikanov 2011), la colle biologique à base d'acide hyaluronique (Friedman 2012), des PLGA (*poly(lactic-co-glycolic acid)*) ou du Matrigel® (des Rieux 2011). Ces différents modèles ont démontré l'efficacité du VEGF sur la reprise fonctionnelle des greffons, lorsqu'il est délivré de la sorte, que cela soit au sein d'alginate, utilisé dans la greffe d'hépatocytes, de la fibrine et la colle biologique, utilisées lors de la greffe de fragments ovarien. Dans notre modèle, nous avons utilisé une matrice constituée d'un gel de collagène de type I, pour lequel une capacité à soutenir la croissance folliculaire avait déjà été démontrée (Telfer 1990). L'efficacité du VEGF à induire l'angiogenèse lorsqu'il est libéré d'une matrice de collagène de type I avait également été mise en évidence préalablement, mais dans le but de stimuler l'ostéogenèse dans la régénération osseuse (Kleinheinz 2010). Ces différents systèmes d'administration du VEGF ont chacun démontré leur potentiel à promouvoir une angiogenèse, et nos résultats le confirment également, mais il n'y a pas eu, à ce jour, d'étude comparative nous permettant d'identifier la matrice idéale.

Nous avons d'abord décidé d'étudier les effets du VEGF₁₁₁, dont l'effet angiogénique a été bien documenté, pour sa propriété d'être non seulement fortement diffusible, avec par conséquent un effet rapide au niveau du transplant, mais surtout pour sa résistance à la protéolyse (Mineur 2007). Suite aux résultats encourageants obtenus avec cette isoforme, nous avons choisi d'étudier le VEGF₁₆₅. Ce dernier a la propriété d'exister à la fois sous forme soluble et sous forme ancrée à la matrice, ce qui pourrait améliorer son profil de libération du collagène.

Nous avons démontré que les deux isoformes du VEGF sont capables d'induire un recrutement vasculaire au sein du transplant, et ce dès 3 jours après la greffe, alors qu'il a été démontré qu'en l'absence de facteurs angiogéniques, la réoxygénation du fragment

n'est obtenue qu'après 5 jours (Van Eyck 2009). Nous avons également mis en évidence qu'un plus grand nombre de fragments étaient porteurs de vaisseaux fonctionnels après 3 jours de transplantation et que la densité de ces derniers était plus importante dans les groupes traités par le VEGF, que ce soit 111 ou 165, que dans les groupes contrôles. Ceci est corrélé à une augmentation significative du contenu en hémoglobine des transplants traités au VEGF₁₁₁. Nous avons également observé, dans nos deux études, l'origine en partie murine de ces vaisseaux fonctionnels avec un effet bénéfique des deux isoformes du VEGF puisque ces vaisseaux ont été retrouvés dans un nombre plus important de transplants lorsqu'ils ont été traités (Figure 19). Nous avons également mis en évidence, dans notre étude sur le VEGF₁₆₅, que ce dernier promeut la connexion vasculaire entre les vaisseaux matures présents au sein du greffon avec les néo-vaisseaux murins qui colonisent ce dernier. Ceci confirme la double origine de la revascularisation du greffon, provenant du greffon lui-même et de l'hôte, comme cela avait déjà été observé (Van Eyck 2010).

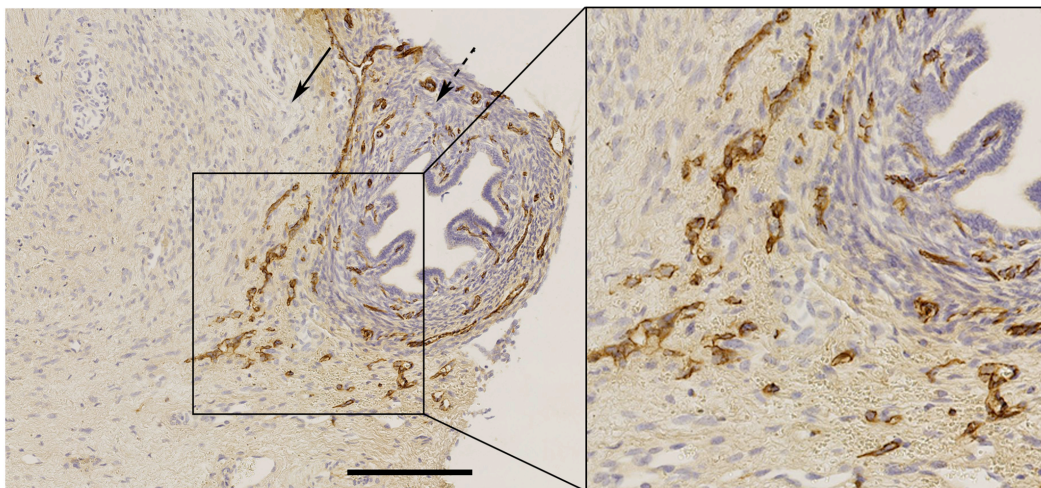


Figure 19 Illustration de la colonisation du greffon par les vaisseaux hôtes. Les vaisseaux murins sont identifiés grâce à une coloration avec un anticorps anti-CD31 spécifique de l'espèce murine. La corne utérine murine est désignée par la flèche en pointillés alors que le greffon est identifié avec une flèche pleine. Barre d'échelle : 200 μ m. Henry et al., *Reprod Biol Endocrinol* 2015.

Malgré cette amélioration de la revascularisation des transplants, nous n'avons pu observer d'impact sur le tissu ovarien à long terme. L'étude de la fibrose après 3 semaines de transplantation, réalisée dans notre **Publication n° 1** sur le VEGF₁₆₅, n'a pas permis de mettre en évidence un effet bénéfique de la molécule angiogénique. Wang et al. ont observé une diminution de la fibrose tissulaire 6 semaines après transplantation, lorsque le greffon avait été incubé préalablement à la greffe dans un milieu contenant du VEGF associé à un facteur de croissance, le bFGF, puis l'administration de ces deux agents par injection sous-cutanées répétées pendant 7 jours suivant la transplantation (Wang 2013). Une greffe plus prolongée dans notre modèle permettrait peut-être de visualiser un effet

bénéfique sur la fibrose. Il avait déjà été démontré auparavant que la fibrose tissulaire observée après greffe était majoritairement liée à la cryopréservation et non à la transplantation (Nisolle 2000). Dans nos études, avec l'utilisation de VEGF seul, nous n'avons pas mis en évidence d'impact sur la survie ou la morphologie des follicules primordiaux. Mais en associant d'autres molécules, tels que le GCSF (Skaznik-Wikiel 2011) ou de la vitamine E (Friedman 2012), il a été démontré que le VEGF permet de maintenir le pool de follicules primordiaux ou de diminuer le nombre de follicules en atrophie. Les effets bénéfiques de la vitamine E sur la survie folliculaire avaient d'ailleurs déjà été observés au préalable (Nugent 1998). Il ne faut cependant pas oublier que dans l'étude de Skaznik-Wikiel et al., une délivrance systémique du VEGF a été réalisée, ce qui sera contre-indiqué en clinique.

Nous avons quand même observé une préservation du nombre de follicules primaires dans les transplants traités au VEGF₁₁₁, 3 semaines après la transplantation. Cependant, la quantification folliculaire réalisée pour cette étude a été effectuée de façon classique avec l'analyse d'une coupe (choisie approximativement au milieu) par fragment. Au cours de nos recherches, nous avons été confrontés à une distribution fortement hétérogène des follicules au sein du cortex ovarien ovin. Cette hétérogénéité folliculaire avait déjà été mise en évidence au sein du cortex ovarien humain (Qu 2000, Schmidt 2003) mais aucune méthode de quantification folliculaire n'avait encore été publiée. Ceci nous a amenés à améliorer notre système de quantification. Afin de limiter l'impact de l'hétérogénéité folliculaire sur les résultats expérimentaux, nous avons dès lors établi un modèle mathématique nous permettant d'estimer le nombre de fragments de cortex ovarien et de coupes histologiques par fragment nécessaires à analyser (**Publication n° 3**). Après avoir analysé plus de 3800 coupes histologiques, nous avons pu déterminer, grâce à l'application d'un modèle statistique complexe, que pour détecter une amélioration de la préservation folliculaire de 10 % suite à l'administration d'un traitement quelconque sur le fragment de cortex ovarien, il fallait au moins examiner 20 fragments avec 40 sections par fragment, pour que la probabilité de l'effet observé soit lié au traitement appliqué (à 84 %) et non à l'hétérogénéité de la distribution folliculaire. Pareillement, si un effet de 25 % est escompté sur la préservation folliculaire, la probabilité que l'effet détecté soit dû au traitement est de 93 % si 10 fragments avec 10 coupes par fragments ont été analysés. Il n'y a, à ce jour, pas d'autre modèle publié quant à la méthode à appliquer pour réaliser une quantification folliculaire correcte. Or, ce type de méthode est nécessaire afin d'homogénéiser les procédés, de pouvoir comparer les résultats obtenus par différentes équipes et surtout de limiter l'impact de l'hétérogénéité folliculaire sur les résultats de manière à ce que ceux-ci soient fiables.

Nous avons utilisé cette méthode de quantification pour notre étude sur le VEGF₁₆₅ (**Publication n° 1**), où nous avons analysé 10 coupes par fragment sur respectivement 15 et 18 fragments pour le groupe contrôle et le groupe traité. Nous avons également répété notre étude du VEGF₁₁₁ avec ce nouveau système de quantification (**Publication n° 4**). Dans cette étude, nous avons confirmé l'effet angiogénique du VEGF₁₁₁ et sa capacité à améliorer la revascularisation des transplants après 3 jours de greffe. Nous avons mis en évidence que l'utilisation du VEGF₁₁₁ dans notre modèle de xéno greffe chez la souris SCID, a un impact bénéfique, bien que non significatif, sur la préservation des follicules primordiaux ($p = 0,061$). Avec notre nouveau système de quantification folliculaire, nous n'avons pas retrouvé l'effet sur les follicules primaires, tel qu'obtenu précédemment (**Publication n° 2**). Dans cette nouvelle étude (**Publication n° 4**), nous avons également comparé la transplantation de fragments ovins, traités ou non au VEGF₁₁₁, sur deux souches de souris, les SCID et les NOD-SCID. L'utilisation de souris immunodéprimées dans les modèles expérimentaux de xéno-transplantation est en effet validée depuis plusieurs décennies. Plusieurs souches murines ont été développées, chacune avec leur déficit immunitaire. Parmi celles-ci, citons les souris NUDE, qui sont athymiques et les souris SCID, qui ont un fond génétique de type BALB/c et sont déficientes en lymphocytes T et B. Les NOD-SCID ont également un fond génétique BALB/c mais un déficit immunitaire plus important, s'étendant aux lymphocytes NK ainsi qu'au système du complément circulant. A l'heure actuelle, dans la littérature, il n'y a pas de consensus concernant la souche de souris immunodéprimée la plus adéquate pour la xénotransplantation de tissu ovarien cryopréservé. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu comparer deux souches de souris, les SCID et les NOD-SCID. Nous avons mis en évidence que les deux souches ne permettaient pas une reprise similaire du greffon. Lors de la greffe des fragments sur des souris de type NOD-SCID, nous n'avons pas mis en évidence d'amélioration de la revascularisation par le VEGF₁₁₁, ni d'impact sur la préservation folliculaire. Par ailleurs, l'architecture tissulaire ainsi que la morphologie folliculaire semble également moins bien conservées chez les NOD-SCID que lors de la greffe sur les souris SCID. Après la greffe, l'immunité semble donc jouer un rôle important dans la récupération du greffon avec peut-être, une implication des cellules NK, puisque celles-ci sont présentes chez les souris SCID et non chez les NOD-SCID. Cependant cette hypothèse nécessite d'être vérifiée et il n'y a pas encore d'étude publiée dans la littérature à ce propos.

Le second axe de nos recherches pour l'amélioration du processus de cryopréservation de tissu ovarien consiste en la lutte contre l'apoptose. En effet, l'apoptose, notamment induite lors de la congélation-décongélation du tissu ovarien et de sa transplantation, participe à la déplétion folliculaire observée et qui peut réduire de 50 à 80 %

la réserve de follicules primordiaux (Liu 2002, Yang 2008). Nous avons décidé d'étudier certains anti-apoptotiques dans les milieux de transport et de congélation de tissu ovin afin d'évaluer leurs impacts lors de la cryopréservation. Plusieurs études avaient déjà mis en évidence une perte folliculaire par apoptose lors de la congélation (Liu 2002, Rimón 2005). Afin d'étudier leurs effets sur la survie folliculaire et la qualité tissulaire, nous avons placé le tissu en culture après sa décongélation (**Publication n° 5**). L'évaluation du tissu directement après décongélation ne reflète pas l'état réel de ce dernier. Pour avoir une première estimation des molécules testées sans faire intervenir la greffe, la culture du cortex ovarien après décongélation nous est apparu être une alternative intéressante.

Plusieurs anti-apoptotiques ont déjà prouvé leur efficacité pour préserver les follicules primordiaux lors de traitements gonadotoxiques, tels que l'Imatinib (Gonfloni 2009) et le S1P (Morita 2000, Paris 2002, Hancke 2007, Kaya 2008, Li 2013, Meng 2014). Le S1P a la particularité d'être à la fois pro-angiogène et anti-apoptotique (Hannun 2008), ce qui le rend très intéressant à étudier dans le cadre de la cryopréservation ovarienne (Soleimani 2011). Son effet est cependant controversé dans la littérature. Il n'a pas démontré d'effet bénéfique lors de l'autotransplantation de tissu ovin frais (Hancke 2009), de la congélation d'ovaires ovins entiers (Onions 2008) ni de la culture de fragments après congélation (Klocke 2015). Cependant, utilisé dans le milieu de congélation d'ovaires murins, il permet d'améliorer le nombre et la morphologie des follicules primordiaux après la transplantation (Jee 2010, Tsai 2013). Avec nos recherches, nous avons confirmé cet intérêt du S1P, puisqu'ajouté au milieu de transport et de congélation de fragments de cortex ovins, il permet d'améliorer la morphologie des follicules primordiaux après le transport mais également après 2 jours de culture. Cette amélioration de la morphologie à 2 jours de culture est corrélée à une augmentation de la prolifération des cellules de la granulosa sous l'effet du S1P. Dans notre étude, nous n'avons pas objectivé d'accroissement de la prolifération des cellules stromales au sein du tissu mis en culture, sous l'effet du S1P, contrairement à ce qui avait été préalablement mis en évidence (Soleimani 2011). Ayant utilisé une concentration plus faible de S1P et une méthode de supplémentation différente, cela pourrait expliquer cette différence de résultat. Dans l'étude réalisée par Soleimani et al., le S1P était non seulement utilisé dans le milieu de préparation et localement au niveau du site de greffe de fragments frais mais surtout injecté en IV et ce, pendant 4 jours après la transplantation. Ce qui n'est pas envisageable cliniquement.

Lors de mes travaux de thèse, nous avons également étudié un second anti-apoptotique, le Z-VAD-FMK, qui est un inhibiteur des caspases. En effet, certaines études ont décrit le rôle des caspases dans l'activation de l'apoptose au sein des cellules de la

granulosa, notamment par l'intermédiaire du système FAS (Stroh 2002, Fauque 2007, Xiao 2010, Zhang 2013). Nos résultats montrent que la supplémentation des milieux de transport et de congélation des fragments avec le Z-VAD-FMK permet d'améliorer la survie du tissu ovarien, tel que mis en évidence par un taux de prolifération des cellules stromales plus important après 2 et 6 jours de culture comparé au contrôle. Nous avons également mis en évidence une préservation de la densité folliculaire ainsi que du nombre de follicules primordiaux morphologiquement normaux sous l'effet du Z-VAD-FMK, et ce à 6 jours de culture. Cet effet sur la préservation folliculaire à 6 jours du Z-VAD-FMK est corrélé à une prolifération plus importante des cellules de la granulosa. Nous confirmons dès lors l'intérêt du Z-VAD-FMK dans la cryopréservation ovarienne, comme cela avait déjà été suggéré par Zhang et al., qui avaient objectivé un effet bénéfique de cette molécule sur le taux d'apoptose et le nombre de jours nécessaires à la restauration d'un cycle œstral après l'autotransplantation d'ovaires murins cryopréservés dans un milieu contenant le Z-VAD-FMK (Zhang 2009).

Nous avons par ailleurs étudié l'effet du Z-VAD-FMK sur des cultures de cellules de la granulosa (**Publication n° 6**). En effet, ces cellules jouent un rôle essentiel dans le développement et la maturation ovocytaire alors que leur disparition par apoptose joue un rôle important dans l'atrésie folliculaire (Hussein 2005). Par conséquent, leur sauvegarde est primordiale pour la survie folliculaire. Or, il a été démontré qu'elles sont plus sensibles que l'ovocyte aux lésions induites par la congélation (Siebzehrubl 2000, Kim 2004), notamment liées à l'activation de l'apoptose (Tirelli 2005, Shin 2006, Mazoochi 2009). L'apoptose folliculaire résulte également de la transplantation et de l'ischémie qui en découle (Liu 2002). Il est donc primordial de protéger les cellules de la granulosa lors de la cryopréservation et de la transplantation du tissu ovarien. L'obtention de cultures primaires de cellules de la granulosa étant malaisée, nous avons utilisé différentes lignées de cellules de granulosa humaines pour notre étude. Nos résultats montrent que le Z-VAD-FMK est capable de prévenir l'apoptose induite par l'étoposide, un agent cytotoxique inhibiteur de la topoisomérase 2. Malheureusement, nous n'avons pu étudier son effet sur l'apoptose induite par l'hypoxie et le manque en nutriments, puisque notre modèle, qui devait mimer les conditions vécues par le tissu après transplantation, n'a pu induire l'apoptose des cellules de la granulosa de nos différentes lignées. Ces dernières répondaient cependant à l'hypoxie avec une modification de l'expression de gènes sensibles à celle-ci, tels que le VEGF et PAI-1. Cette haute résistance des cellules au stress pourrait être liée aux modifications subies par les cellules lors de leur immortalisation (Rainey 1994). Par conséquent, l'utilisation de cultures primaires de cellules de la granulosa semble plus appropriée pour étudier les anti-apoptotiques *in vitro* dans des conditions d'hypoxie et de manque en nutriment. Dans notre

étude, nous avons cependant mis en évidence la présence d'une perte cellulaire en condition d'hypoxie dans une de nos lignées, les HGL5, bien que nous n'ayons pas objectivé d'activation des voies de l'apoptose. Ceci suggère qu'une autre voie de mort cellulaire pourrait être impliquée dans la déplétion folliculaire engendrée en condition hypoxique. Il est connu que la déplétion en sérum peut être à l'origine de phénomène d'autophagie dans plusieurs types de cultures cellulaires (Mizushima 2007). L'autophagie est un processus catabolique intracellulaire indispensable à la survie cellulaire. Elle consiste en un « recyclage » du cytoplasme avec une dégradation d'organelles ou de complexes protéiques volumineux, qui sont regroupés dans des autophagosomes avant d'être digérés par les lysosomes. Ce processus permet à la cellule de survivre en cas de déficit énergétique, carence en nutriment ou hypoxie, mais également d'éliminer certains composants endommagés (Klionsky 2000, Mizushima 2007). Ce processus peut néanmoins aboutir à la mort cellulaire dans certaines circonstances, par exemple lorsque l'apport en nutriments n'est pas restauré (Maiuri 2007). Il y a peu de littérature concernant l'implication de l'autophagie au niveau folliculaire. Il a déjà été évoqué que l'autophagie pourrait être à l'origine d'une déplétion folliculaire lorsque l'ovaire est exposé à certains toxiques, en dehors de tout processus de cryopréservation (Duerrschmidt 2006, Gannon 2012). Il a également été mis en évidence le rôle de l'autophagie au sein des cellules murines de la granulosa lors de la folliculogénèse et de l'atrésie folliculaire (Choi 2010) et également lors de la vitrification d'ovocytes murins (Bang 2014). Malgré les nombreuses recherches sur ce sujet, les mécanismes régulant la mort cellulaire lors de la cryopréservation et de la transplantation de cortex ovarien sont, à l'heure actuelle, encore méconnus. Une meilleure compréhension de ces derniers pourrait aider à améliorer les traitements et par conséquent la qualité des fragments ovariens greffés et la préservation folliculaire.

Perspectives

Notre travail de recherche contribue à l'amélioration de la technique de la cryopréservation et de la transplantation du tissu ovarien, bien que de nombreux progrès soient encore à réaliser. Nous avons été confrontés à plusieurs limites lors de l'utilisation de nos modèles, dont le travail pour leur résolution sera poursuivi au-delà de cette thèse.

Tout d'abord, nous poursuivons actuellement nos expériences sur l'étude des anti-apoptotiques *in vitro*, sur des cultures primaires de cellules de la granulosa. Ceci est possible grâce à une collaboration avec le Centre de Procréation Médicalement Assistée de l'Université, qui nous fournit le fluide folliculaire, à partir duquel les cellules de la granulosa sont isolées. Nous espérons dès lors pouvoir mettre au point un modèle nous permettant de mimer les conditions d'ischémies et de dénutritions subies par le tissu lors de la transplantation et ce afin d'évaluer *in vitro* le Z-VAD-FMK sur la survie des cellules de la granulosa, mais également le S1P et probablement d'autres types de traitements par la suite.

Une limitation importante dans notre travail est l'utilisation du cortex ovarien ovin. Ce choix avait été réalisé pour une accessibilité plus aisée au tissu ovin qu'au tissu humain. Par ailleurs, ces derniers possèdent une architecture et une physiologie comparables, rendant la brebis plus intéressante que la souris pour nos expériences. Cependant, nous avons été confrontés à certains problèmes, limitant nos travaux de recherches. En effet, il existe peu d'anticorps spécifiques de l'espèce ovine, réduisant le nombre d'analyses immunohistochimiques réalisables. Par exemple, nous n'avons pas réussi à mettre au point un marquage de l'apoptose qui soit spécifique au sein de nos fragments. Pour pallier à ce problème, nous avons débuté une collaboration avec l'équipe de transplantation de l'Université, ce qui nous permettrait d'obtenir du tissu ovarien humain. Celui-ci sera utilisé pour confirmer les résultats obtenus chez la brebis lors de nos différentes études mais également d'approfondir les analyses et de fixer d'autres objectifs. En effet, nous souhaiterions confirmer les résultats des anti-apoptotiques *in vivo*, grâce à notre modèle de xénogreffe. L'objectif est de mettre au point un modèle, combinant un pro-angiogène, le VEGF, avec un anti-apoptotique, afin de préserver la réserve folliculaire lors de la congélation et de la transplantation.

Le but ultime de nos recherches est de pouvoir proposer une technique de cryopréservation ovarienne réalisable en clinique, tant du point de vue éthique que pratique, afin d'améliorer les résultats obtenus sur la protection de la réserve folliculaire et de pouvoir offrir aux patientes plus qu'un espoir de préserver leur fertilité.

Conclusions

La préservation de la fertilité est un domaine en pleine expansion. Parmi les options envisageables, la cryopréservation de cortex ovarien est la seule possibilité qui peut être offerte dès le plus jeune âge de la patiente. Cependant, cette technique est toujours considérée comme étant du domaine de la recherche et des améliorations doivent encore être apportées afin d'améliorer la qualité des transplants et la survie folliculaire.

Nos recherches ont permis d'optimiser les modèles expérimentaux utilisés dans ce domaine. Nous avons mis au point un système de quantification folliculaire permettant de réduire l'incidence de l'hétérogénéité de la distribution des follicules primordiaux au sein du cortex ovarien sur les résultats obtenus lors de l'utilisation d'un traitement donné. Nous avons également mis en évidence que les souris de type SCID représentent une souche de souris plus adaptée à la xénotransplantation de cortex ovarien que les souris de type NOD-SCID.

Grâce à nos recherche sur le VEGF, nous avons mis en évidence que ce dernier, que ce soit l'isoforme 111 ou 165, améliorerait la revascularisation du greffon lorsque celui-ci était enrobé dans une matrice contenant le VEGF au préalable de la greffe. Nous n'avons cependant pas mis en évidence d'impact significatif sur la préservation de la réserve folliculaire, bien que le VEGF₁₁₁ tende à préserver les follicules primordiaux.

Nous avons également montré un effet bénéfique des anti-apoptotiques lorsqu'ils sont utilisés dans les milieux de transport et de congélation du cortex ovarien. Nous avons observé un effet plus précoce du S1P, qui améliore la qualité des follicules primordiaux après 2 jours de culture. Le Z-AVD-FMK a un effet similaire mais plus tardif, après 6 jours de culture, tout en préservant la densité folliculaire globale. Cette drogue permet également d'améliorer la qualité du tissu avec une prolifération cellulaire plus importante, et ce à 2 et 6 jours de culture.

En conclusion, nos travaux contribuent à l'amélioration de la cryopréservation ovarienne, que cela soit en en améliorant les modèles utilisés en recherche mais également en améliorant la qualité tissulaire, tant après la congélation qu'après la transplantation.

