

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2007

N°143

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES DE BIOLOGIE MEDICALE

par

Marie LOOSVELD

Née le 20 décembre 1978 à Croix

Présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 2007

**Congélation du cortex ovarien
en vue de la préservation de la fertilité chez la
petite fille et la jeune femme :
Etat des lieux, revue de la littérature,
bilan de l'expérience au CHU de Nantes**

Président : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE

Directeur de Thèse : Madame le Docteur Sophie MIRALLIE

Membres : Madame le Professeur Berthe Marie IMBERT

Madame le Docteur Françoise MECHINAUD

SOMMAIRE

INTRODUCTION	6
---------------------	----------

PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE	10
---	-----------

I. Rappel sur la physiologie ovarienne	11
A. L'ovogénèse	11
B. Le vieillissement ovarien	15
1. Diminution de la réserve ovarienne	15
2. Etiologies	16
3. Marqueurs de la réserve ovarienne	17
a) Le dosage de la FSH	17
b) le dosage de l'oestradiol	19
c) Le dosage de l'inhibine B	19
d) Le dosage de l'AMH	20
e) Compte des follicules antraux	26
II. Traitement à l'origine d'une atteinte prématurée de la fonction ovarienne	27
A. Action de la chimiothérapie anticancéreuse sur la fonction gonadique	28
B. Action de la radiothérapie sur la fonction gonadique	35
III. Les stratégies de préservation de la fonction ovarienne lors d'un traitement gonadotoxique	40
A. Les traitements par agonistes de la GnRH	40
B. Les traitements par inhibiteurs de l'apoptose	44
C. La transposition ovarienne	45
D. La cryopréservation embryonnaire	46
E. La cryopréservation ovocytaire	48
IV. La cryopréservation du tissu ovarien	50
A. Principes généraux de cryobiologie	50
1. Généralités sur les effets des basses températures sur les systèmes biologiques	50
2. La congélation de l'eau pure	51
3. La congélation des solutions salines	52
4. La congélation des cellules	52
5. Vitesse de refroidissement	53

6. Les agents cryoprotecteurs	54
a) Propriétés	54
b) Toxicité des cryoprotecteurs	56
B. Historique de la cryoconservation ovarienne	56
C. Les modalités de la congélation du tissu ovarien	59
1. Le prélèvement	59
2. La préparation des fragments ovariens	60
3. La congélation des fragments ovariens	61
a) Choix du cryoprotecteur	62
b) Congélation lente du tissu ovarien	63
c) La vitrification	66
D. Les modalités d'utilisation du tissu ovarien congelé	68
1. Autogreffe de fragments ovariens	69
a) Greffe orthotopique	69
b) Greffe hétérotopique	73
c) Perspectives	75
d) Risques de la greffe	77
2. La xenogreffe	78
3. La maturation folliculaire <i>in vitro</i>	80
E. Les indications de la cryopréservation du tissu ovarien	81
F. Les prérequis à la congélation du tissu ovarien	82
1. Information et consentement de la patiente	82
2. Approches psychologiques	83

<p>Partie II : Pratique de la cryoconservation ovarienne au sein du service de médecine et de biologie de la reproduction du CHU de Nantes</p>

85

I. Objectifs	86
II. Matériels et méthodes	86
A. Sélection des patientes	86
B. Critères d'inclusion	87
C. Critères d'exclusion	88
D. Prélèvement du tissu ovarien	88
E. Préparation du tissu ovarien	89
F. Protocole de congélation	89
G. Analyse histologique du cortex ovarien	91
H. Evaluation de la réserve ovarienne des patientes au moment de la congélation	92
I. Analyse statistique	93
III. Résultats	94
A. Evolution du nombre d'autoconservations ovariennes	94

B. Répartition par groupe d'âge	94
C. Répartition selon le type de pathologie	95
D. Type de traitement gonadotoxique délivré avant la cryoconservation	96
E. Etude anatomopathologique	98
F. Bilan hormonal	99
G. Evolution	101
IV. Données du GRECOT de mars 2007	102
A. Evolution du nombre de prélèvements ovariens réalisés en France	102
B. Distribution par groupe d'âge	103
C. Indications de cryoconservation ovarienne	103
D. Distribution des traitements castrateurs	104
Partie III : DISCUSSION	106
CONCLUSION	121
ANNEXES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1	L'atrésie folliculaire	12
Figure 2	L'ovogénèse	14
Figure 3	Décroissance folliculaire avec l'âge	16
Figure 4	Variation des taux d'AMH en fonction de l'âge	21
Figure 5	Action régulatrice de l'AMH sur l'ovaire post-natal	21
Figure 6	Décroissance de l'AMH avec l'âge et corrélation entre les taux d'AMH et le nombre de follicules antraux	22
Figure 7	Evolution des taux plasmatiques d'AMH au cours de la vie de femme	24
Figure 8	Valeur médiane de l'AMH chez les femmes de plus de un an	25
Figure 9	Evolution des valeurs de l'AMH avec l'âge selon Lashen	26
Figure 10	Pourcentage d'insuffisance ovarienne après chimiothérapie ; variation en fonction de l'âge	30
Figure 11	Taux d'insuffisance ovarienne après chimiothérapie en fonction du type de cancer	32
Figure 12	Décroissance folliculaire après injection d'un agent alkylant	33
Figure 13	Dosage de l'hormone anti-mullerienne au décours d'un traitement par chimiothérapie	35
Figure 14	Effet des champs d'irradiation sur la fonction ovarienne	38
Figure 15	Histoire thermique	51
Figure 16	Effets de la vitesse de refroidissement sur la cristallisation intra et extra cellulaire	53
Figure 17	Nature des lésions dues à la congélation	54
Figure 18	Ovariectomie par coelioscopie	60
Figure 19	Prélèvements du cortex ovarien	61
Figure 20	Restauration de cycles menstruels après greffe orthotopique de fragments ovariens	72
Figure 21	Grefe hétérotopique	74
Figure 22	Courbe de descente en température réalisée grâce à un congélateur programmable	91
Figure 23	Coupes de cortex ovarien	92
Figure 24	Evolution du nombre de prélèvements ovariens réalisés au CHU de Nantes entre 1995 et Mai 2007	94
Figure 25	Age des patientes au moment de la congélation ovarienne	95
Figure 26	Répartition selon le type de pathologie	96
Figure 27	Patientes ayant eu un traitement gonadotoxique avant la cryoconservation ovarienne	96
Figure 28	Nombre de patientes ayant reçu une chimiothérapie par alkylants avant la cryopréservation ovarienne	97
Figure 29	Indications du prélèvement d'ovaire	97
Figure 30	Corrélation entre le compte folliculaire par mm ² et l'âge des patientes	99
Figure 31	Evolution du nombre de prélèvements ovariens colligés par le GRECOT entre 1995 et 2007	102
Figure 32	Age des patientes ayant bénéficié d'une cryoconservation ovarienne en France	103
Figure 33	Patientes ayant eu un traitement gonadotoxique avant cryoconservation en France	104
Figure 34	Comparaison des valeurs d'AMH retrouvées chez nos patientes avec celles retrouvées par Lee <i>et al.</i>	112
Figure 35	Comparaison du nombre de follicules primordiaux et primaires retrouvés par mm ² avec l'étude réalisée par Poirot <i>et al</i> en 2002	114
Figure 36	Compte folliculaire par mm ² en fonction de l'âge	115
Figure 37	Courbe ROC	115
Figure 38	Nombre de follicules primordiaux et primaires retrouvés par mm ² dans le cortex ovarien de nos patientes	116
Figure 39	Résultats des bilans hormonaux effectués après greffe de tissu ovarien lors de l'étude de Meiorow	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Taux de grossesse en fonction du dosage de la FSH	18
Tableau 2	Corrélation entre le nombre de follicules antraux, le nombre d'ovocytes et le taux de grossesse	27
Tableau 3	Pourcentage d'insuffisance ovarienne en fonction du protocole de chimiothérapie	31
Tableau 4	Intérêt d'un traitement par agonistes de la GnRH	42
Tableau 5	Effet protecteur des agonistes de la GnRH sur la fonction ovarienne en cas de traitement par chimiothérapie	43
Tableau 6	Survie des follicules primordiaux humains après congélation avec divers ccryoprotecteurs	63
Tableau 7	Comparaison de différents protocoles de congélation du tissu ovarien humain	64
Tableau 8	Protocoles de congélation	65
Tableau 9	Restauration d'une fonction ovarienne après greffe orthotopique	71
Tableau 10	Taux de follicules ovariens intacts après congélation	77
Tableau 11	Valeurs d'AMH retrouvées chez des femmes présentant un statut folliculaire normal	93
Tableau 12	Analyse statistique réalisée chez les patientes de moins de 10 ans	100
Tableau 13	Analyse statistique réalisée chez les patientes âgées de 10 à 15 ans	100
Tableau 14	Analyse statistique réalisée chez les patientes âgées de plus de 15 ans	101
Tableau 15	Principales caractéristiques des 50 patientes suivies lors de notre étude	124
Tableau 16	Résumé des cas de cryoconservation et de greffe de cortex ovarien chez la femme, d'après Courbière <i>et al.</i>	126

Introduction

Les récents progrès des traitements anti-cancéreux ont permis l'amélioration de la survie des patients ; une étude épidémiologique estime qu'en 2010, un adulte sur 250 sera un survivant d'un cancer traité pendant l'enfance (Kim, 2006).

Chez ces patients survivants de cancer, se pose désormais le problème de la qualité de vie après la maladie. Or, ces traitements anti-cancéreux, souvent très agressifs, sont responsables d'effets secondaires à long terme comme notamment une atteinte de la fonction ovarienne (Poirot *et al.*, 2005). En effet, les ovaires sont très sensibles aux traitements par chimiothérapie, essentiellement aux agents alkylants, et aux radiations ionisantes (Kim, 2006). La perte de la fertilité liée aux traitements du cancer est l'une des complications les plus cruellement ressentie par la majorité des patients.

Ainsi, se préoccuper de la fertilité des patients traités pour cancer est devenu une démarche incontournable dans leur prise en charge.

Avant la mise en route d'un traitement gonadotoxique, différentes solutions sont disponibles pour tenter de préserver la fertilité ; pour les adultes ou les patientes post-pubères, il est possible de proposer la cryoconservation d'embryons et /ou d'ovocytes matures et / ou de cortex ovarien (Poirot *et al.*, 2005). Parmi ces techniques, seule la cryoconservation de cortex ovarien est possible chez la petite fille prépubère.

La congélation de fragments ovariens est une technique qui donne des espoirs importants car elle ne nécessite pas de traitement préalable et permet de stocker un grand nombre de follicules qui pourraient ensuite être greffés ou cultivés *in vitro* afin d'obtenir des ovocytes matures.

En septembre 2004, une première naissance a été rapportée après congélation – décongélation et autogreffe orthotopique de cortex ovarien (Donnez *et al.*, 2004); une deuxième naissance a ensuite été annoncée en juillet 2005 (Meirow *et al.*, 2005). Depuis, trois nouvelles grossesses ont encore été rapportées (Demeestere *et al.*, 2006) (Demeestere, 2007) (Andersen, 2007).

En raison de ces résultats prometteurs, il est de plus en plus important de proposer une congélation de cortex ovarien aux patientes qui doivent avoir des traitements stérilisants.

Actuellement, de nombreux CECOS pratiquent en France des prélèvements de tissu ovarien en vue d'une cryoconservation. Le cadre légal de la congélation du tissu ovarien était initialement fixé par l'arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en Assistance Médicale à la Procréation (AMP) (article 2.6) qui stipulait que « la congélation d'ovocytes et les prélèvements de fragments d'ovaire en vue de conservation pour une éventuelle AMP ultérieure restaient du domaine de la recherche et devaient donc entrer dans le cadre d'un protocole de recherche et faire l'objet d'une demande à un Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) ». La révision de la loi relative à la bioéthique adoptée le 6 août 2004 reconnaît expressément cette activité dans le code de la Santé publique : « **Art. L. 2141-11.** - *En vue de la réalisation ultérieure d'une assistance médicale à la procréation, toute personne peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de son tissu germinifère (...) lorsqu'une prise en charge médicale est susceptible d'altérer sa fertilité, ou lorsque sa fertilité risque d'être prématurément altérée.* » Le décret d'application de décembre 2006 confirme la possibilité de congeler les tissus germinaux (ovaire ou testicule) dans un cadre légal avec la mise en place d'autorisations et d'agrément spécifiques pour cette activité et n'oblige plus théoriquement le recours à un protocole de recherche.

Notre travail a comporté deux parties : la première partie bibliographique nous a permis de recueillir l'essentiel des données de la littérature sur la cryopréservation ovarienne.

La seconde partie de notre travail a concerné les patientes dont du tissu ovarien a été cryoconservé au sein du service de médecine et de biologie de la reproduction du CHU de Nantes de juillet 1995 à mai 2007. Afin d'évaluer la réserve ovarienne de ces patientes au moment de la cryopréservation mais également après rémission complète de leur pathologie, nous avons effectué à la

fois une analyse biologique (dosages de marqueurs de la réserve ovarienne)
ainsi qu'une analyse anatomopathologique de leur cortex ovarien.

Partie I

Revue de la littérature

I. Rappel sur la physiologie ovarienne :

A. L'ovogenèse :

Contrairement à la spermatogenèse qui commence à la puberté et continue tout au long de la vie, le stock ovocytaire de la femme est déjà constitué avant sa naissance.

De la 15^{ème} semaine du développement jusqu'au 7^{ème} mois de la vie fœtale, les ovogonies (cellules germinales diploïdes) se multiplient par des mitoses de type somatique.

Au terme de leur multiplication, les ovogonies isolées sont entourées chacune d'une couche de cellules folliculeuses pour constituer des follicules primordiaux.

Dans le follicule, l'ovogonie devient un ovocyte de 1^{er} ordre (ovocyte I) qui établit des relations étroites avec les cellules folliculeuses (jonctions perméables et jonctions adhérentes).

L'ovocyte entre alors en mitose et, dans le noyau, se déroule la 1^{ère} prophase de méiose (prophase I). Les ovocytes I, bloqués en prophase I dans leur follicule primordial, constituent une réserve qui ne sera pas renouvelée mais ira, au contraire, en s'épuisant jusque la ménopause.

En effet, dès la vie intra-utérine, des follicules sortent en permanence du stock de réserve pour entamer leur croissance, sans pouvoir la mener à son terme ; ensuite, à la puberté, avec le démarrage de l'activité cyclique de l'axe hypothalamo-hypophysaire, la croissance folliculaire peut se poursuivre jusqu'à l'ovulation, mais la très grande majorité des follicules qui entrent en croissance s'atrophient avant l'ovulation.

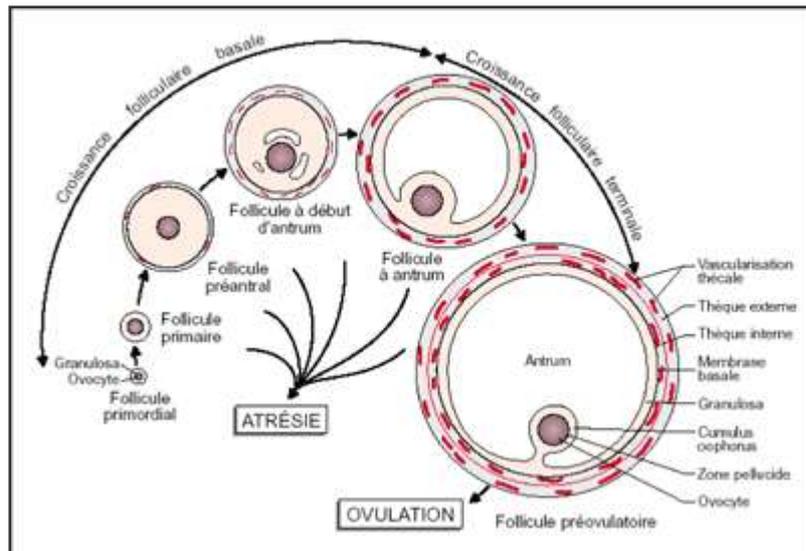


Figure 1 : L'atrésie folliculaire (<http://interstices.info>).

Le nombre de follicules est donc d'environ 7 millions à la fin du 7^{ème} mois de grossesse, d'un million à la naissance et de 400000 à la puberté. A partir de 38 ans, la dégénérescence s'accélère jusqu'à disparition totale des ovocytes à la ménopause.

Le blocage de la méiose est dû à des substances transmises par les cellules folliculeuses à travers les jonctions perméables : OMI (Oocyte Maturation Inhibitors) et AMPc.

Au cours de l'évolution du follicule gamétogène, du follicule primaire au follicule mûr de de Graaf, a lieu la croissance ovocytaire ; le diamètre de l'ovocyte passe de 40 à 120 μ .

Ces ovocytes I restent donc bloqués pendant une « période d'hibernation » de 10-15 ans voire plus.

A compter de la puberté, dans les 36 heures précédant l'ovulation, l'ovogenèse s'achève par une phase de maturation qui rend l'ovocyte apte à être fécondé. La maturation est provoquée par la décharge ovulatoire des hormones gonadotropes (FSH+LH) qui entraîne la sécrétion de progestérone par les cellules folliculeuses et une rupture des jonctions perméables. Cette maturation est à la fois cytoplasmique et nucléaire ; elle permet la reprise de la méiose. La

1^{ère} mitose de méiose s'achève donc et est immédiatement suivie, sans réplication, par la 2^{ème} mitose qui se bloque en métaphase.

Cela aboutit à la formation d'un ovocyte II (cellule haploïde bloquée en métaphase II) et d'un 1^{er} globule polaire.

C'est dans cet état que l'ovocyte sera expulsé au moment de l'ovulation.

La méiose ne s'achèvera que si la fécondation a lieu, lors de la pénétration du spermatozoïde.

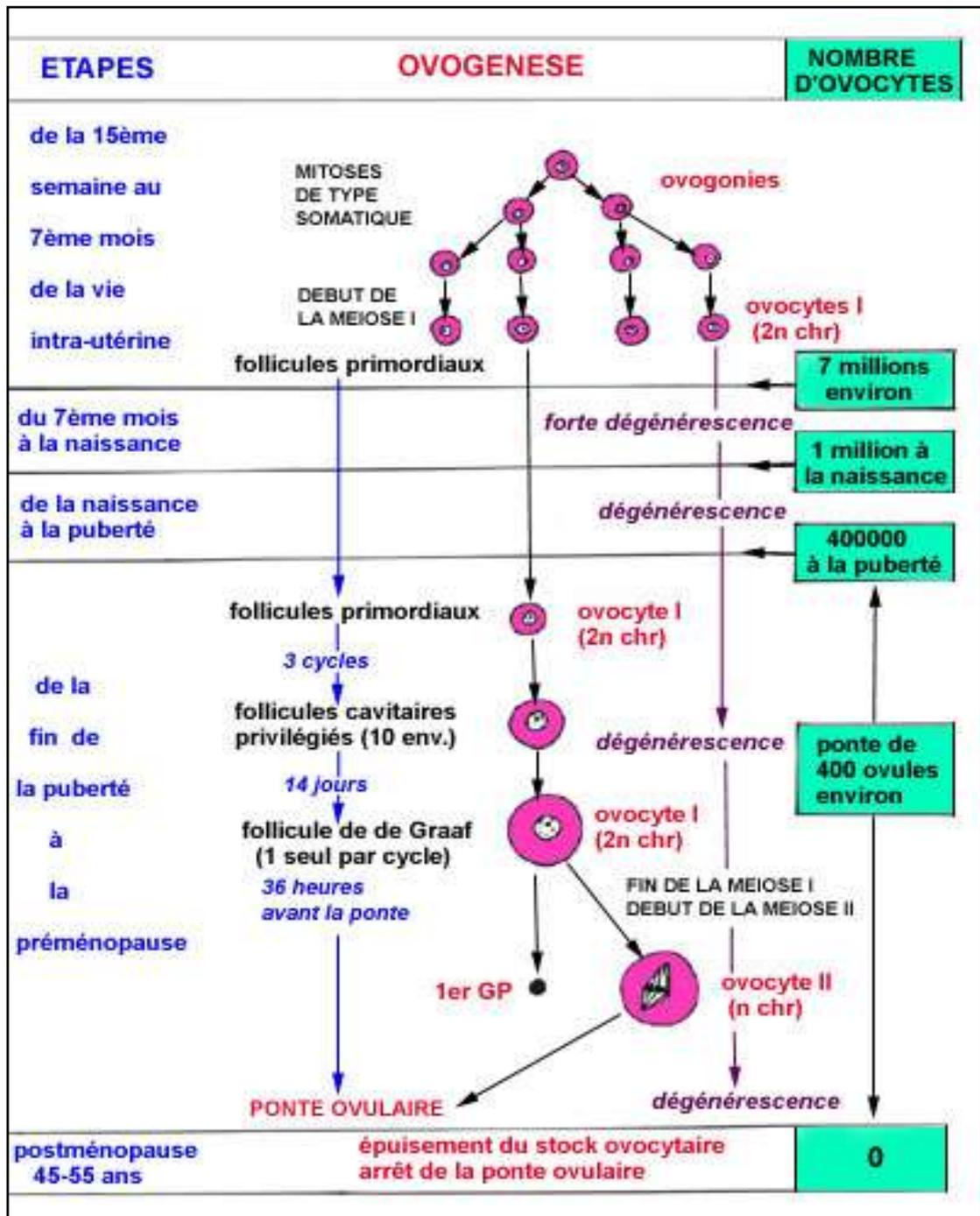


Figure 2 : L'ovogénèse (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Ovogen%C3%A8se>).

Chez la femme, sur le million de follicules sains présents à la naissance, moins de 500 atteindront la taille ovulatoire. Le destin « normal » de la majorité des follicules est donc de disparaître par atresie (Faddy *et al.*, 1992).

Ainsi toute atteinte de cette réserve folliculaire peut être à l'origine d'une insuffisance ovarienne précoce; une étude réalisée en 1992 a montré que la perte de 90 % de la réserve ovarienne avant l'âge de 14 ans provoquerait une insuffisance ovarienne à l'âge de 27 ans (Faddy *et al.*, 1992).

B. Le vieillissement ovarien :

1. Diminution de la réserve ovarienne :

Le stock de follicules primordiaux est fixé avant la naissance et il diminue avec l'âge de la femme jusqu'à la disparition totale des ovocytes à la ménopause. La ménopause est donc déclenchée par la chute du nombre de follicules ovariens en dessous d'un chiffre seuil.

Faddy et Gosden ont mis en place en 1992 un modèle mathématique permettant de prévoir le nombre de follicules « restants » en fonction de l'âge des patientes. Ce modèle mathématique leur a permis de définir un seuil critique folliculaire (Faddy *et al.*, 1992).

Leur courbe de décroissance folliculaire en fonction de l'âge présente une cassure à l'âge de 37.5 ans, âge correspondant à un nombre de follicules de 25 000. A 37.5 ans on note donc une accélération de l'atrésie folliculaire et à 51 ans, âge moyen de la ménopause dans la population générale, il ne reste plus qu'environ 1000 follicules. Il a donc été convenu que le chiffre de 1000 follicules correspondait au chiffre seuil de ménopause.

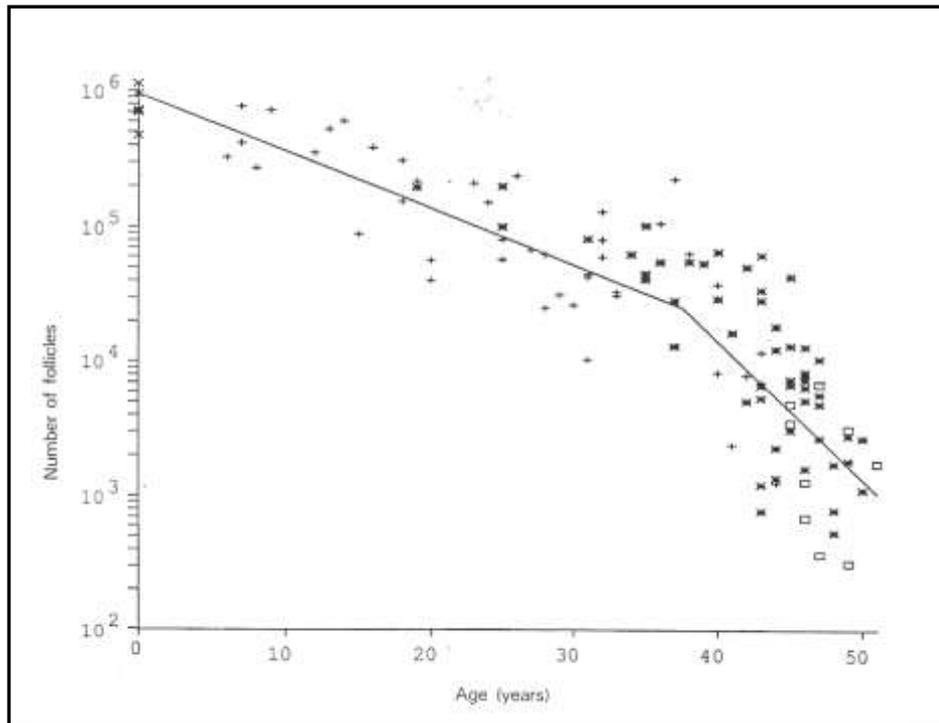


Figure 3 : Décroissance folliculaire avec l'âge (Faddy et al., 1992).

En 1996, Faddy et Gosden ont réétudié et modifié ce modèle mathématique. En effet, ils ont montré que le seuil de ménopause variait au sein de la population en fonction de l'estimation de la taille du stock folliculaire à la naissance.

Selon leur modèle, quand le stock folliculaire a atteint le chiffre de 10 000, la grande majorité des femmes seront ménopausées dans les 5 à 10 années à venir (Faddy & Gosden, 1996).

2. Etiologies :

Le processus de dégénérescence par apoptose est très important car près de 80 % des cellules germinales présentes dans le fœtus à mi-gestation auront disparu à la naissance. Les périodes de dégénérescence des cellules germinales sont bien identifiées : ce sont les phases de mitoses goniales, la prophase de la méiose I et la période de formation des follicules primordiaux. Les résultats expérimentaux confirment que la mort cellulaire, lors de ces périodes, se produit par apoptose (Levy, 2005).

L'importance de l'apoptose ovocytaire en période fœtale ne doit pas faire oublier qu'il existe une apoptose ovocytaire massive postnatale, puis dans

l'ovaire adulte, qui s'accélère avec l'âge et culmine chez la femme dans la cinquième décennie, aboutissant à la ménopause (< 1000 ovocytes).

Cette décroissance folliculaire serait donc sous l'influence de l'apoptose mais elle pourrait également être faiblement modulée par des facteurs environnementaux tels que le tabac, la consommation d'alcool, l'âge de la ménopause maternelle, la classe sociale... (Torgerson *et al.*, 1994).

En effet, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'une relation négative entre tabac et fertilité spontanée ou dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation. Le tabac serait responsable d'une augmentation du délai nécessaire à concevoir (de 6 mois à 1 an), d'une baisse de la fécondabilité et d'une survenue plus précoce de 2 ans environ de la ménopause (Kinney *et al.*, 2007, Sepaniak *et al.*, 2006).

Cependant, afin de pouvoir confirmer l'influence de ces facteurs environnementaux sur l'âge de la ménopause, des études complémentaires semblent nécessaires.

3. Marqueurs de la réserve ovarienne :

Plusieurs paramètres témoins du vieillissement ovarien ont été évalués depuis la fin des années 80.

a) Le dosage de la FSH :

La FSH (hormone folliculostimulante) est une gonadotrophine sécrétée par l'hypophyse antérieure ; elle a sous contrôle le développement des follicules ovariens, par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques à FSH des cellules de la granulosa. Sa sécrétion est stimulée et modulée par la GnRH (Gonadotrophine Releasing Hormone), décapeptide hypothalamique ; la FSH est également sous la dépendance du rétrocontrôle des taux circulants d'oestradiol, de progestérone et d'inhibine.

Le dosage de la FSH de base au 3^{ème} jour du cycle correspond à la technique la plus simple et la moins coûteuse permettant d'explorer « l'âge ovarien ». Ce

dosage fait donc partie du bilan de première intention dans l'étude de la réserve ovarienne.

Les valeurs normales de FSH en début de cycle, chez des femmes jeunes, sont généralement inférieures ou égales à 10 UI/L.

Une élévation de la FSH traduit une insuffisance ovarienne débutante ou prématurée entraînant, en assistance médicale à la procréation, une diminution des résultats.

Plusieurs études ont montré qu'un taux élevé de FSH était, indépendamment de l'âge civil, corrélé à une mauvaise réponse ovarienne à la stimulation et à un faible taux de grossesse (Commenges-Ducos, 2002).

Dès 1989, Scott *et al.*, étudiant 758 cycles de FIV (fécondation *in vitro*), avaient mis en évidence une chute des taux de grossesses lorsque le taux de FSH au 3^{ème} jour du cycle était élevé (Scott *et al.*, 1989).

	Taux de FSH (mUI/mL)		
	< 15	15 à 24,9	> 25
% Grossesse	17	9,3	3,6

Tableau 1 : Taux de grossesse en fonction du dosage de la FSH (Scott et al., 1989).

En 1995, Licciardi *et al.*, étudiant 592 cycles de FIV, montraient l'absence de grossesse chez les patientes présentant un taux de FSH supérieur à 17 mUI/mL (Licciardi *et al.*, 1995).

Une étude réalisée en 2002 plaçait le seuil pronostic de FSH à 11.4 mUI/mL au delà duquel il n'y avait pas de naissance même s'il y avait eu un test de grossesse positif (Commenges-Ducos, 2002).

En 2000, Pennarubia *et al.*, rapportaient une étude portant sur une centaine de femmes, et dans laquelle ils déterminaient un seuil de FSH plasmatique à 9,45 UI/L au-delà duquel il existait un risque élevé d'annulation du cycle de stimulation (Penarrubia *et al.*, 2000).

En 2004, Hazout *et al.*, retrouvaient également la même valeur seuil de FSH lors d'une autre étude.

Enfin, une étude de Roberts *et al.*, réalisée en 2005, démontrait que plus le nombre de dosages anormaux de FSH augmentait, plus les taux de grossesse étaient bas. En effet, quand ils observent un dosage élevé de FSH, s'il y a eu

deux dosages élevés auparavant, le taux de grossesse observé est de 0%, alors que ce taux est de 22 % si les dosages précédents étaient normaux. Il est donc important de tenir compte de l'historique des dosages plasmatiques de FSH (Hazout, 2006).

b) Le dosage de l'oestradiol :

L'oestradiol est un marqueur de maturation folliculaire. C'est une hormone sécrétée par la granulosa du follicule dominant par aromatisation des androgènes venant de la thèque interne et de la glande intersticielle.

Le dosage d'oestradiol s'effectue également au 3^{ème} jour du cycle et son taux doit être normalement inférieur à 50 pg/mL.

En effet, en 1995, Licciardi *et al.*, montraient l'absence de grossesse chez les patientes présentant un taux d'oestradiol supérieur à 45 pg/mL au 3^{ème} jour du cycle (Licciardi *et al.*, 1995).

A l'usage, la valeur pronostique de ces deux marqueurs fut progressivement contestée du fait de variations intercycles nombreuses impliquant la prise en compte de 2 à 3 cycles avant toute décision thérapeutique.

c) Le dosage de l'inhibine B :

L'inhibine B est sécrétée lors de la phase folliculaire par les cellules de la granulosa des follicules pré-antraux et les petits follicules antraux.

L'inhibine B est un inhibiteur de la production de FSH.

En pré ménopause, ce sont en premier lieu les taux d'inhibine B qui diminuent, entraînant progressivement une élévation de la FSH (Deffieux & Antoine, 2003).

Son dosage au 3^{ème} jour du cycle, en complément des dosages de FSH et d'oestradiol, permet d'estimer la capacité sécrétoire et la réserve ovarienne.

Les premiers résultats publiés par Seifer *et al.*, en 1997 mettaient en évidence une corrélation entre le nombre d'ovocytes recueillis et le taux d'inhibine B à J3 d'un cycle précédent. En effet, les patientes présentant un taux d'inhibine B inférieur à 45 pg/mL obtenaient une moindre réponse à une stimulation ovarienne (Seifer *et al.*, 1997).

Une valeur basse (inférieure à 45 pg/mL) fait donc craindre une mauvaise réponse à la stimulation ovarienne, mais la valeur prédictive de l'inhibine reste controversée.

En effet, une étude de Fanchin *et al.* réalisée en 2003 montre que l'inhibine B est beaucoup moins bien corrélée au nombre de petits follicules antraux que l'AMH (hormone antimüllérienne) ($r = 0.29$ versus $r = 0.74$), et qu'elle n'est pas corrélée à l'âge, contrairement à l'AMH (Fanchin *et al.*, 2003).

De plus, en 2006, Hazout *et al.*, mettent en évidence que l'interprétation de l'inhibine B doit se baser sur la durée du cycle précédant qui si elle est inférieure à 28 jours entraîne des valeurs faussement élevées pouvant donner lieu à un mauvais diagnostic. L'inhibine B est donc interprétable uniquement lorsqu'on est certain du jour du dosage (J2-J3) (Hazout, 2006).

d) Le dosage de l'AMH :

L'AMH (hormone antimüllérienne) est une glycoprotéine, faisant partie de la famille du TGF β (*Transforming growth factor*), produite par les cellules de la granulosa des follicules de l'ovaire. Elle est synthétisée de la fin de la vie fœtale jusqu'à la ménopause. La synthèse est élevée dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance (follicules pré-antraux et petits follicules antraux) puis la synthèse diminue progressivement lors de la croissance et la différenciation folliculaire. Enfin, les cellules de la granulosa des follicules atrétiques synthétisent très peu d'AMH, et la synthèse est nulle dans les follicules primordiaux et le corps jaune (Deffieux & Antoine, 2003).

Selon Deffieux et Antoine, la sécrétion ovarienne d'AMH augmente progressivement à partir de la puberté, tout en restant à des taux très faibles puis les taux d'AMH vont diminuer avec l'âge pour devenir indétectables à la ménopause (Deffieux & Antoine, 2003).

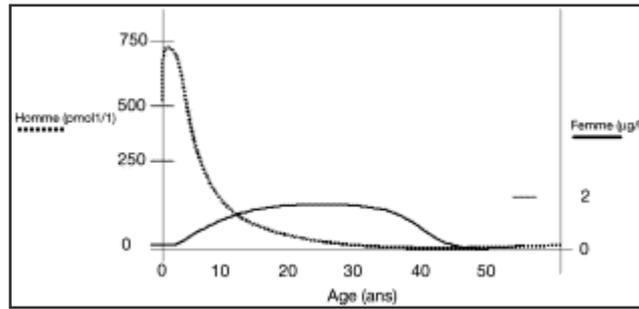


Figure 4: Variation des taux d'AMH en fonction de l'âge (Deffieux & Antoine, 2003) .

L'AMH joue 2 rôles principaux dans l'ovaire post-natal : tout d'abord un rôle inhibiteur du recrutement des follicules primordiaux ; l'AMH évite donc une déplétion folliculaire précoce en inhibant le recrutement initial ; puis un rôle d'inhibition de la réponse des follicules pré-antraux et des petits follicules antraux à la FSH.

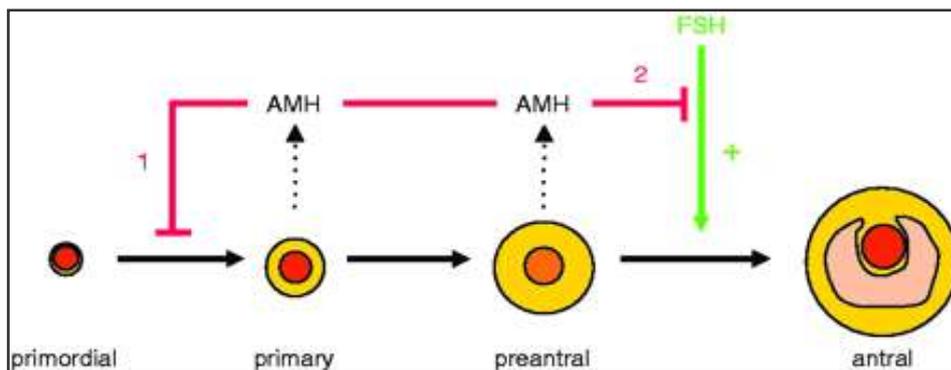


Figure 5: Action régulatrice de l'AMH sur l'ovaire post-natal : (1) l'AMH inhibe le recrutement initial et (2) inhibe l'effet stimulateur de la FSH sur la croissance des follicules préantraux et antraux. (Visser *et al.*, 2006).

Dans le cadre de la fécondation *in vitro* , une mauvaise réponse ovarienne semble corrélée à des taux abaissés d'AMH plasmatique à J3. Dans une étude prospective, van Rooij retrouve en effet que les taux d'AMH sont significativement plus bas dans le groupe des mauvaises répondeuses. De plus, il retrouve que ce paramètre a une valeur prédictive proche de celle de l'échographie à J3 (dénombrement des follicule antraux) qui reste pour lui le meilleur critère prédictif (van Rooij *et al.*, 2002).

Dans une étude longitudinale parmi 41 femmes en pré ménopause normoovulantes et 13 femmes ménopausées, De Vet *et al.*, ont observé que les taux d'AMH diminuaient significativement au cours du temps. L'intervalle entre les deux visites de chaque patiente était d'environ trois ans. Les concentrations d'AMH variaient de 2,1 ng/mL (0,1-7,4 ng/mL) à 1,3 ng/mL (0,0-5,0 n/mL) entre les deux dosages successifs chez les femmes en pré ménopause contrairement aux autres marqueurs de l'ovulation (FSH, inhibine B, oestradiol) (de Vet *et al.*, 2002) . Grâce à cette étude, les auteurs ont mis en évidence le rôle important de l'AMH en tant que marqueur de la réserve ovarienne.

De plus lors de cette étude, ils ont confirmé la corrélation entre les taux plasmatiques d'AMH et le nombre de follicules antraux.

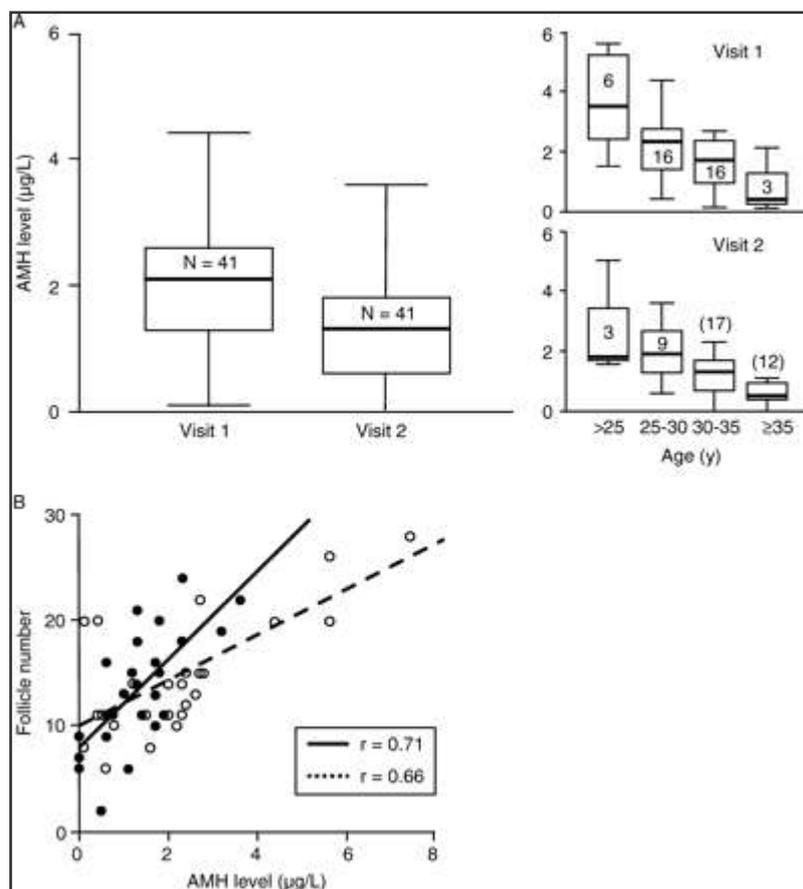


Figure 6 : (A) Décroissance de l'AMH avec l'âge ; (B) Corrélation entre les taux d'AMH et le nombre de follicules antraux ; (de Vet *et al.*, 2002).

Dans une étude rétrospective sur des sérums congelés provenant de femmes ayant eu une tentative d'AMP, Seifer *et al.*, ont montré l'intérêt des dosages d'AMH au 3^{ème} jour du cycle. Les 28 femmes ayant moins de 6 ovocytes ponctionnés présentaient des concentrations sériques d'AMH de 1,0 +/- 0,4 ng/mL alors que les 79 patientes ayant plus de 11 ovocytes ponctionnés avaient des taux d'AMH 2 à 2,5 fois plus élevés (2,5 +/- 0,3 ng/mL). Ces données montrent donc la relation entre le taux d'AMH au 3^{ème} jour du cycle et le nombre d'ovocytes ponctionnés ainsi que le rôle de l'AMH en tant que marqueur hormonal de la réponse ovarienne (Seifer *et al.*, 2002).

De plus, Hazout *et al.*, ont montré la nette supériorité de l'AMH en terme de prédictivité de grossesse sur l'ensemble des autres marqueurs associés (Hazout, 2005).

De mars à juin 2005, Freour *et al* ont réalisé une étude prospective sur 69 patientes en cours de stimulation ovarienne pour FIV. Lors de cette étude était effectué un dosage sérique de l'AMH à J0 de la stimulation par gonadotrophines. Grâce à cette étude, les auteurs ont défini un seuil d'AMH en dessous duquel ils n'obtenaient aucune grossesse. En effet les femmes enceintes (n=23) avaient toutes un taux d'AMH > à 1.4 µg/L; ils ont donc montré que l'AMH sérique inférieure à 1.4 µg/L avait une valeur prédictive négative de 100 % pour l'initiation d'une grossesse (Freour *et al.*, 2006).

En 2003, une étude a mise en évidence le rôle de l'AMH en tant que marqueur de la réserve ovarienne chez les jeunes femmes traitées pour cancer pendant l'enfance. Lors de cette étude, Bath *et al* ont montré que les patientes survivantes de cancer avaient des taux d'AMH inférieurs à ceux des patientes contrôles ainsi que des taux de FSH supérieurs (Bath *et al.*, 2003).

Par ailleurs, une étude réalisée en 2006 a montré qu'il était possible de doser l'AMH à n'importe quel jour du cycle, les taux d'AMH plasmatiques étant très stables au cours du cycle (Feyereisen *et al.*, 2006). Cela donne encore un avantage non négligeable au dosage de l'AMH par rapport aux autres marqueurs de la réserve ovarienne.

En conclusion, il est important de noter que les taux plasmatiques d'AMH déclinent au cours du temps, au fur et à mesure que la réserve ovarienne diminue, bien avant que la FSH augmente et que l'inhibine baisse (Deffieux &

Antoine, 2003); l'AMH paraît donc être un excellent marqueur de la réserve ovarienne.

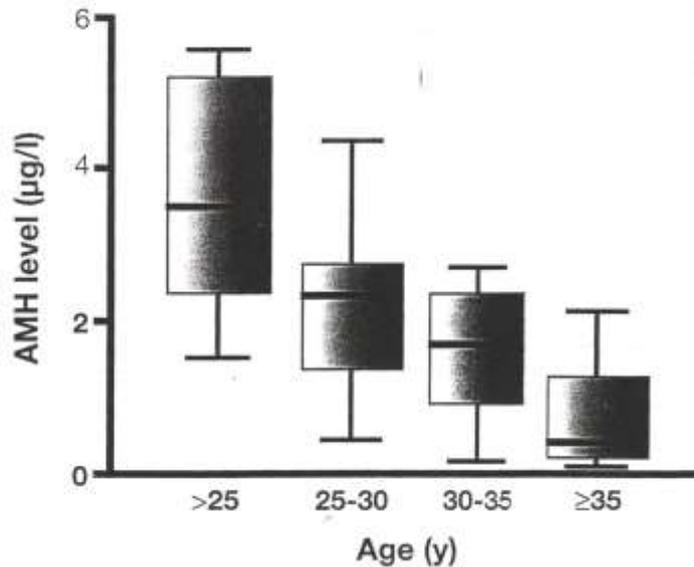


Figure 7 : Evolution des taux plasmatiques d'AMH au cours de la vie de femme (Visser, 2006).

Chez les petites filles et les très jeunes femmes, les variations de l'AMH ont également été étudiées.

En 1996, Lee *et al.* ont dosé l'AMH chez 53 patientes âgées de moins de un an et chez 172 patientes âgées de 1 à plus de 32 ans afin d'évaluer les valeurs normales d'AMH chez les femmes en fonction de leur âge (Lee *et al.*, 1996).

Chez les patientes de moins de 1 an, ils ont retrouvé une valeur moyenne d'AMH égale à 0.66 ng/mL et une médiane à 0.48 ng/mL.

Chez les patientes de plus de 1 an, les valeurs médianes étaient comprises entre 0.6 ng/mL à un an et 1.2 ng/mL chez les femmes de plus de 32 ans.

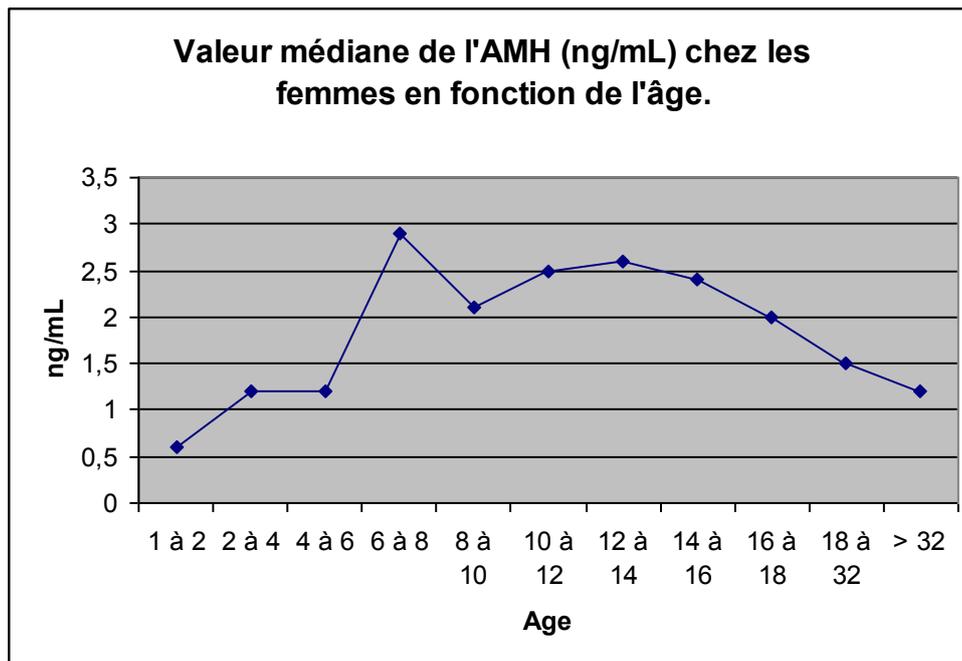


Figure 8: Valeur médiane de l'AMH chez les femmes de plus de un an (Lee *et al.*, 1996).

En 2007, une nouvelle étude réalisée sur 32 patientes s'est intéressée aux valeurs de l'AMH à la naissance (prélèvement de sang de cordon), à 7, 9 et 11 ans. Lors de cette étude, les dosages étaient réalisées par une technique ELISA (technique ELISA Immunotech).

Les résultats des dosages de l'AMH sérique (valeur médiane) obtenus à la naissance, 7, 9 et 11 ans étaient respectivement de 1.2 (0.98-1.75), 3.78 (3.29-4.4), 4.76 (4.2-5.6) et 4.1 (3.3-4.9) ng/mL. Entre la naissance et l'âge de 7 ans, le taux d'AMH augmentait donc de 250 % (140-390) ; entre 7 et 9 ans, il n'augmentait plus que de 28 % (14.5-42) puis entre 9 et 11 ans il diminuait de 19 %.

Cette étude mettait en évidence que le taux d'AMH déclinait dès le début de la puberté puisqu'il commençait à diminuer dès l'âge de 9 ans (Lashen., 2007).

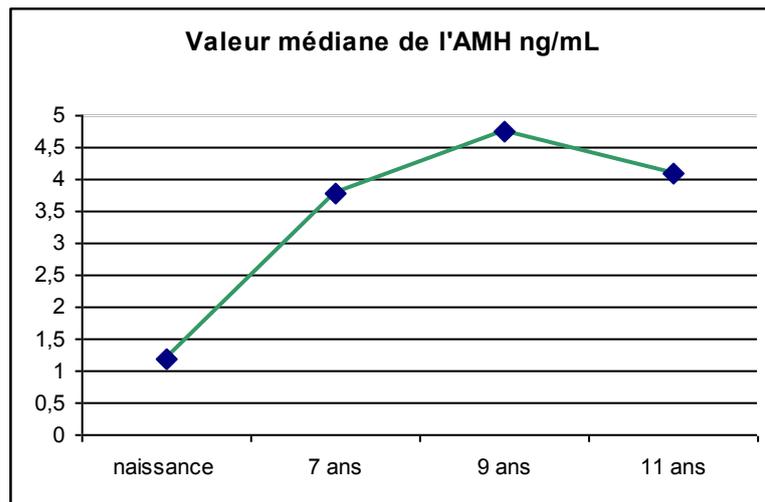


Figure 9: Evolution des valeurs de l'AMH avec l'âge selon Lashen (Lashen., 2007)

e) Compte des follicules antraux :

Le compte des follicules antraux par échographie est un examen facile, peu coûteux et reproductible.

En 1997, Tomas a été un des premiers à mettre en évidence la valeur prédictive du compte des follicules antraux en début de cycle sur la réponse ovarienne chez 166 femmes qui débutaient leurs premiers cycles de FIV. Il a démontré que la somme des follicules antraux des deux ovaires était corrélée au nombre d'ovocytes ponctionnés, corrélation plus forte que l'âge seul (Tomas *et al.*, 1997).

En 1998, Chang a également mis en évidence, lors d'une étude prospective sur 149 cycles, que le compte des follicules antraux était un puissant facteur prédictif de réponse ovarienne en FIV. Lors de cette étude, il a retenu une valeur seuil de 4 follicules antraux en dessous de laquelle, même si le taux de FSH était inférieur à 10 UI/L, le taux de grossesse était nul (Chang *et al.*, 1998).

En 2003, Hazout a établi une corrélation entre le nombre de follicules antraux retrouvé lors de l'examen échographique, le nombre d'ovocytes retrouvés après stimulation et le taux de grossesse (Ebrard-Charra *et al.*, 2005).

Nombre total de follicules antraux	Réponse espérée
<3	Mauvaise réponse à la stimulation, % grossesse presque nul
3 à 5	Réponse faible, plus de cycles annulés que la moyenne, taux faibles de grossesse
6 à 7	Bonne réponse, bon taux de grossesse
8 à 15	Excellente réponse, risque modéré d'hyperstimulation, excellent taux de grossesse
> 15	Réponse de type OPK, risque important d'hyperstimulation, excellent taux de grossesse

Tableau 2 : Corrélation entre le nombre de follicules antraux, le nombre d'ovocytes et le taux de grossesse.

Enfin, dans une méta analyse effectuée en 2005, Hendricks *et al.* ont évalué la valeur prédictive des follicules antraux en FIV en termes de réponse ovarienne à la stimulation et de chances de grossesse. Puis ils ont comparé les résultats à ceux issus d'une méta analyse de 32 études évaluant les dosages de FSH à J3. L'ensemble de ces travaux indiquent que le compte de follicules antraux à J3 est un marqueur prédictif de la réponse ovarienne et que sa place dans le bilan de réserve ovarienne doit être préconisée. De plus ils ont retrouvé que le nombre de follicules antraux avaient une valeur pronostique plus importante que le dosage de FSH à J3 pour identifier les mauvaises répondeuses à la stimulation ovarienne (Hendriks *et al.*, 2005).

II. Traitement à l'origine d'une atteinte prématurée de la fonction ovarienne :

Les agents antiméiotiques, tels que la chimiothérapie et la radiothérapie, peuvent être à l'origine d'une toxicité gonadique importante associée à des mutations génétiques au niveau des cellules germinales (Meirow & Nugent, 2001).

En effet, 42 % des patientes traitées pour un cancer par chimiothérapie (agents alkylants) et radiothérapie avant l'âge de 20 ans sont ménopausées dès l'âge de 31 ans (contre 5 % des patientes témoins) (Bath *et al.*, 2003, Byrne *et al.*, 1992).

A. Action de la chimiothérapie anticancéreuse sur la fonction gonadique :

Les principaux médicaments utilisés en chimiothérapie anticancéreuse sont divisés en différentes classes thérapeutiques selon leur mode d'action (www-ulpmed.u-strasbg.fr/medecine).

Dans les protocoles thérapeutiques, ces agents sont le plus souvent associés afin d'obtenir un effet synergique mais au prix d'une augmentation des effets secondaires.

Les principales classes sont :

- les **alkylants** qui forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne ADN et inhibent ainsi la réplication : chlorambucil, ifosfamide, cyclophosphamide, melphalan, carboplatine, procarbazine, busulfan, cisplatine.....
- les **antimétabolites** qui bloquent ou détournent une ou plusieurs voie de synthèse de l'ADN : methotrexate, mercaptopurine, thioguanine, fludarabine, cytarabine, clofarabine, gemcitabine, hydroxyurée.....
- les **agents intercalants** qui induisent ou stabilisent des coupures de l'ADN ; ils comprennent la classe des anthracyclines : epirubicine, daunorubicine, doxorubicine, adriamycine.....
- les **agents scindants** (« ciseaux chimiques ») qui provoquent des fragmentations de l'ADN et la libération de bases : bléomycine.....
- les anticancéreux agissant sur le fuseau dont les **poisons du fuseau** qui bloquent les cellules en métaphase : vinblastine, vincristine, vindésine.....et les **épipodophyllotoxines** qui inhibent la topoisomérase II (enzyme impliquée dans la torsion et la détorsion de la double hélice d'ADN) : VP16, étoposide.....

La chimiothérapie est indiquée dans de nombreux cancers de l'enfant et de l'adulte comme les hémopathies malignes (LAM, LAL, Lymphome...) mais également les tumeurs solides tels que le neuroblastome, le sarcome d'Ewing.

Les facteurs pronostiques, impliqués dans l'altération de la fonction ovarienne après chimiothérapie, sont essentiellement liés à l'âge de la patiente au moment du traitement, au type de la maladie qui va déterminer le protocole thérapeutique, à la nature et à la dose du traitement, à sa durée et à sa répétition (Fenichel, 2005).

L'âge de la patiente est en effet un facteur déterminant par l'état de la réserve ovarienne qu'il implique.

Dans une étude de Whitehead réalisée en 1983, 44 patientes atteintes de Maladie de Hodgkin et âgées en moyenne de 23 ans, au début du traitement, étaient traitées par chimiothérapie de type « MOPP » (moutarde azotée, oncovin, procarbazine, prednisolone).

17 d'entre elles ont conservé des cycles réguliers à la fin du traitement, 10 ont présenté une oligoaménorrhée et 17 une aménorrhée définitive. Les 17 patientes développant une aménorrhée définitive étaient significativement plus âgées que celles conservant des cycles menstruels réguliers (moyenne d'âge de 30 ans contre 22 ans). De plus toutes les patientes de plus de 36 ans étaient ménopausées au décours du traitement (Whitehead *et al.*, 1983).

Cette relation à l'âge a également été démontrée par Blumenfeld en 1999 qui trouve un taux moyen d'insuffisance ovarienne prématurée après traitement par CMF (cyclophosphamide, méthotrexate, fluorouracil) de 40 % chez les femmes de moins de 40 ans et de 76 % à partir de 40 ans (Blumenfeld *et al.*, 1999).

De plus, avec l'augmentation de l'âge des patientes, l'aménorrhée survient de plus en plus rapidement, pour des doses cumulées d'alkylants de plus en plus faibles ; ainsi, la dose totale de cyclophosphamide responsable d'une

aménorrhée a été estimée à 20.4 g avant 30 ans et à 5.2 g à partir de 40 ans (Koyama *et al.*, 1977).

En 2006, une étude était réalisée sur 423 patientes traitées par 6 cycles de « CEF » (Cyclophosphamide, Epirubicine, Fluorouracil) pour un cancer du sein. Après 6 cycles de chimiothérapie, une insuffisance ovarienne était retrouvée chez 24 % des patientes de moins de 35 ans, 38 % des patientes âgées de 35 à 40 ans et 67 % des patientes de plus de 40 ans. Cette étude montre donc clairement l'augmentation de l'incidence de l'insuffisance ovarienne après chimiothérapie avec l'augmentation de l'âge des patientes (Mastro *et al.*, 2006).

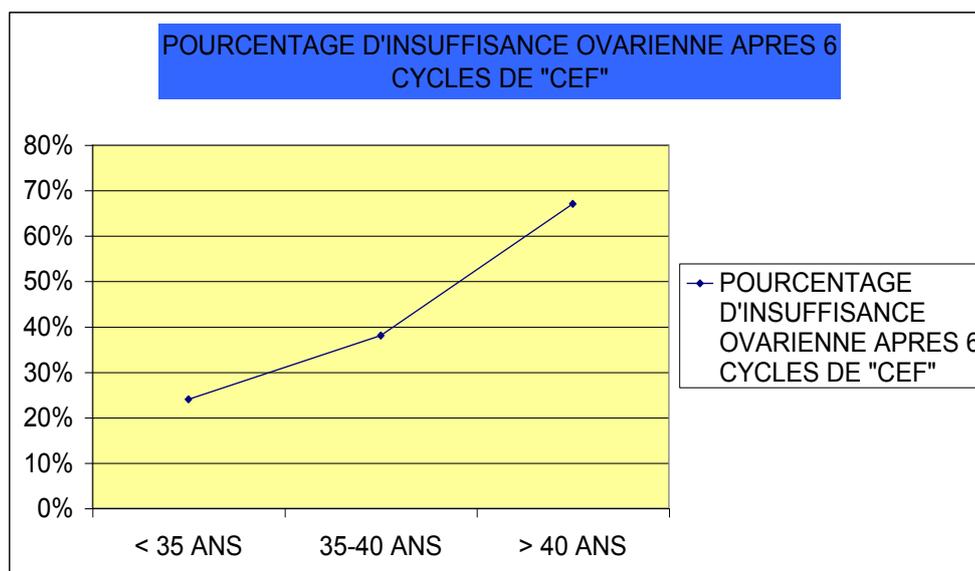


Figure 10: Pourcentage d'insuffisance ovarienne après chimiothérapie; variation en fonction de l'âge (Mastro *et al.*, 2006).

Cette différence peut s'expliquer par l'existence d'une moindre réserve de follicules ovariens chez les patientes plus âgées. En effet, le traitement par chimiothérapie est responsable de la destruction des follicules ovariens quelque soit l'âge de la patiente ; cependant plus la patiente est âgée, plus sa réserve ovarienne est diminuée ce qui provoque plus rapidement la destruction totale du stock de follicules ovariens (Meirow, 2000).

En ce qui concerne la chimiothérapie, les agents les plus délétères sur la fonction ovarienne sont les agents alkylants ; ceux-ci accélèrent l'atrésie des follicules primordiaux. Cela a été démontré chez le rongeur ; la prise par le rongeur de 75 mg/kg de cyclophosphamide est responsable de la destruction d'environ 50 % de la réserve de follicules primordiaux (Meirow *et al.*, 1999).

Le caractère délétère de ces agents alkylants a également été démontré dans l'espèce humaine par Meirow en 2000. Celui-ci a comparé leur action stérilisante à celle d'autres agents antimitotiques. Il retrouve une insuffisance ovarienne de 42.4 % en cas d'utilisation d'agents alkylants contre 14 % lorsque ces agents ne sont pas utilisés (Meirow, 2000).

Des patientes atteintes d'un cancer du sein, et traitées par un protocole de chimiothérapie utilisant un agent alkylant, présentent une aménorrhée beaucoup plus fréquente par rapport aux patientes traitées sans alkylant (Mastro *et al.*, 2006).

Type de protocole de chimiothérapie	% de patientes présentant une aménorrhée (âge < 40 ans)
CMF x 6 cycles	20 à 75 %
MF x 6 cycles	9 %

Tableau 3: Pourcentage d'insuffisance ovarienne en fonction du protocole de chimiothérapie (Mastro *et al.*, 2006).

CMF = Cyclophosphamide+Méthotrexate+Fluorouracil

MF = Méthotrexate+Fluorouracil

Cela pourrait s'expliquer par le fait que les agents alkylants exercent leurs effets cytotoxiques en l'absence de prolifération cellulaire à la différence des agents antimétabolites (Blumenfeld *et al.*, 1999). Ils peuvent en outre détruire les follicules primordiaux du stock de réserve.

Une étude portant sur 168 patientes a été réalisée par Meirow; l'insuffisance ovarienne des patientes a été évaluée après traitement par chimiothérapie afin d'étudier le risque d'insuffisance ovarienne en fonction du type de cancer et du protocole de chimiothérapie utilisé. La moyenne d'âge de ces patientes était de 29 ans et toutes avaient des cycles réguliers avant traitement. Parmi ces 168 patientes, 47 étaient atteintes de leucémie aiguë myéloïde (LAM), 36 de lymphome non hodgkinien (LNH), 47 de maladie de Hodgkin et 38 de cancer du sein.

Ces patientes avaient bénéficié de protocoles de chimiothérapie dits « conventionnels ». Après traitement, 34 % d'entre elles souffraient d'une insuffisance ovarienne. Le pourcentage d'insuffisance ovarienne variait en fonction du diagnostic initial puisque celui-ci influait, bien entendu, sur le type de chimiothérapie utilisée.

Le taux d'insuffisance ovarienne était de 15 % en cas de LAM, 44 % en cas de LNH, 32 % en cas de maladie de Hodgkin et de 50 % en cas de cancer du sein (Meirow, 2000).

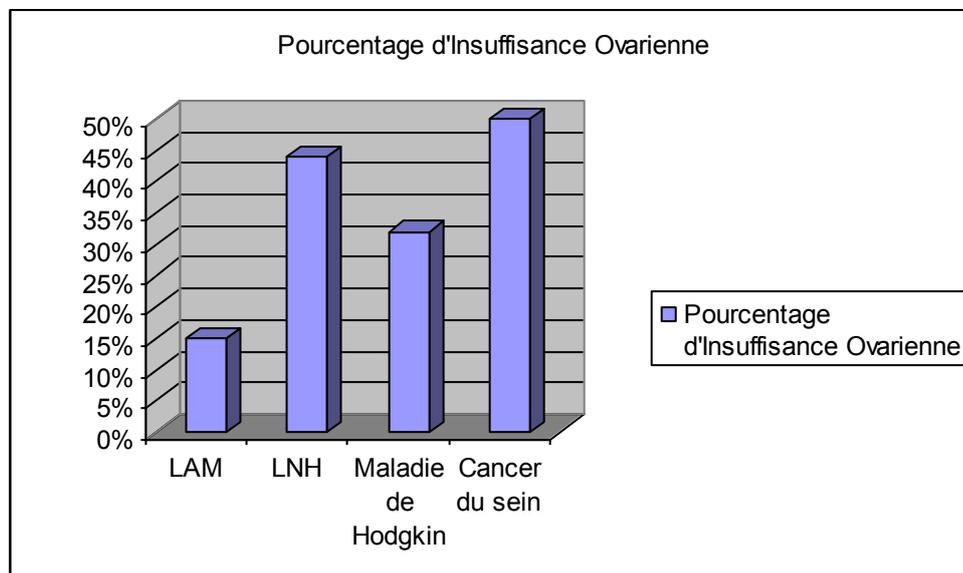


Figure 11: Taux d'insuffisance ovarienne après chimiothérapie en fonction du type de cancer (Meirow, 2000).

La dose cumulée de chimiothérapie a également un impact sur l'insuffisance ovarienne ; en 1990, Goldhirsch *et al.* ont démontré que les patientes traitées par une cure de CMF présentaient un taux d'insuffisance

ovarienne de 10 % pour les plus jeunes et de 33 % pour les plus âgées ; ces taux augmentaient respectivement à 33 % et 81 % après six cures (Goldhirsch *et al.*, 1990).

En 1999, une étude réalisée chez le rongeur confirmait cette relation entre la dose de chimiothérapie reçue et l'importance de la chute du nombre de follicules primordiaux retrouvés après analyse des ovaires. Pour cette étude, une injection de cyclophosphamide, à doses différentes, était réalisée chez 21 souris et 12 souris témoins recevaient une injection d'eau stérile. Le nombre de follicules primordiaux retrouvés étaient de 2034 dans le groupe contrôle, n'ayant pas reçu de cyclophosphamide ; il n'était plus que de 907 après la prise d'une dose de 75 mg/kg de cyclophosphamide et de 630 après une dose de 100 mg/kg ; le compte des follicules primordiaux étaient réalisés 7 jours après l'injection de l'agent alkylant (Meirow *et al.*, 1999).

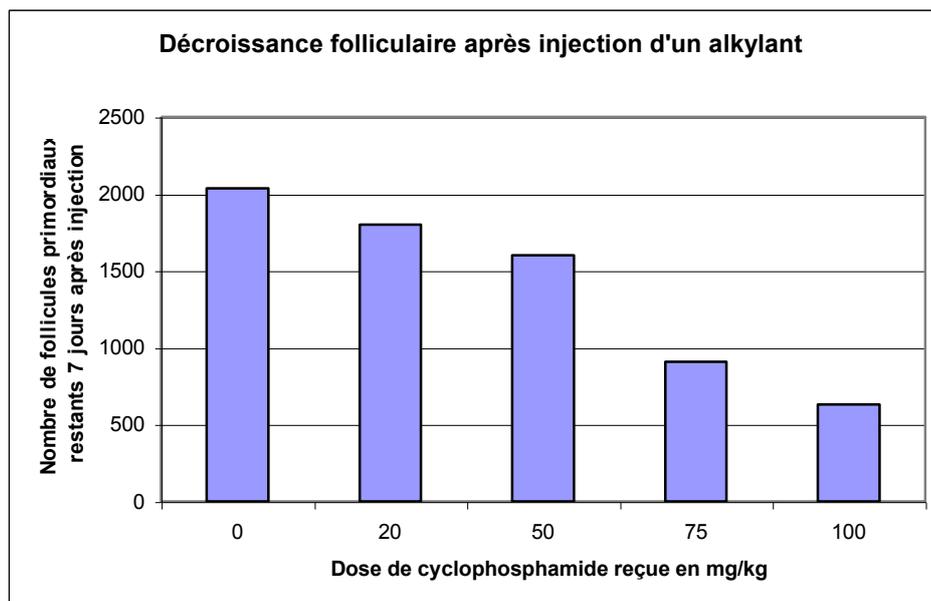


Figure 12: Décroissance folliculaire après injection d'un agent alkylant (Meirow *et al.*, 1999).

Le mécanisme exercé par la chimiothérapie sur l'ovaire est encore imparfaitement compris ; il serait dû à une accélération de l'apoptose touchant les cellules folliculeuses. De plus, associé à ce mécanisme d'apoptose, le traitement

par chimiothérapie serait responsable d'une altération des vaisseaux sanguins ovariens ainsi que de l'apparition de zones de fibrose dans la corticale de l'ovaire (Meirow *et al.*, 2007).

Une reprise des règles après traitement gonadotoxique n'est pas synonyme de respect de l'intégrité de la réserve ovarienne ; on constate régulièrement l'installation secondaire de troubles du cycle voire la survenue précoce d'une insuffisance ovarienne plusieurs années après la fin du traitement (Marmor, 1999). Une étude réalisée sur 100 survivantes de cancer survenu pendant l'enfance a montré que même si 70 d'entre elles conservaient des cycles menstruels normaux à la fin du traitement, elles présentaient un volume ovarien plus petit (4.8 cm contre 6.8 cm) avec un nombre de follicules antraux par ovaire, détectés à l'échographie, plus faible (7.5 contre 11) par rapport à un groupe témoin de même âge (Larsen *et al.*, 2003b).

Une autre étude a permis de comparer la fonction ovarienne d'un groupe de 21 patientes traitées pendant l'enfance pour cancer par rapport à celle de 21 patientes témoins de même âge. Ces 2 groupes de patientes présentaient des cycles menstruels réguliers et un taux de FSH < 10 UI/L. Malgré un profil hormonal normal, les patientes survivantes de cancer présentaient à l'échographie un nombre total de follicules par ovaire plus petit par rapport au groupe témoin (8 contre 11).

Ces patientes présentent donc une réserve ovarienne affaiblie du fait de leur traitement anti-cancéreux et un risque majeur d'insuffisance ovarienne prématurée (Larsen *et al.*, 2003a). Il est donc important de conseiller à ces femmes, dans la mesure du possible, de ne pas trop différer un éventuel projet parental.

En janvier 2007, une étude prospective était réalisée au CHU de Copenhague chez 13 patientes âgées de 18 à 35 ans atteintes de maladies de Hodgkin, de lymphomes non Hodgkinien, de cancers du sein ou de leucémies. Un suivi endocrinien et échographique était réalisé avant la première cure de chimiothérapie ainsi que pendant les 4 premières cures.

Les résultats étaient les suivants :

- **dès la première cure** de chimiothérapie, les dosages d'AMH et d'inhibine B étaient diminués ;
- une baisse très importante du nombre de follicules antraux étaient objectivée dès la seconde cure de chimiothérapie ;
- après les 4 cures de chimiothérapie, les taux de FSH et de LH étaient significativement augmentés ;

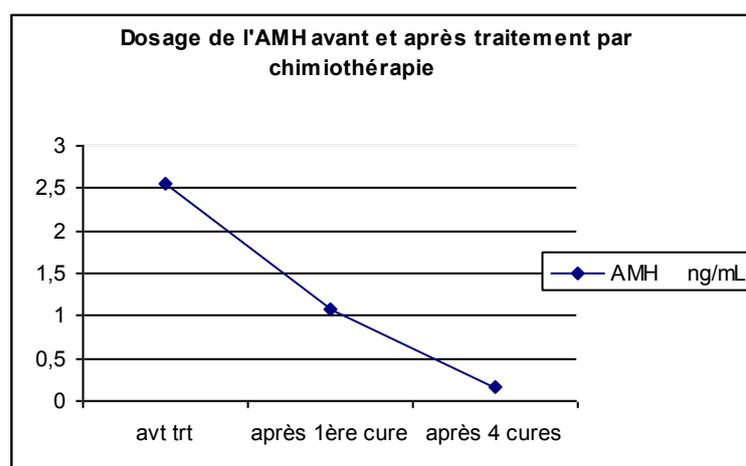


Figure 13: Dosage de l'hormone antimüllérienne au décours d'un traitement par chimiothérapie (Rosendahl, 2007)

Cette étude récente nous confirme donc l'importante toxicité de la chimiothérapie sur la fonction ovarienne et ce dès la première cure (Rosendahl, 2007).

B. Action de la radiothérapie sur la fonction gonadique :

Le risque d'insuffisance ovarienne précoce dépend de la dose reçue, de son fractionnement, des champs d'irradiation et de l'âge de la patiente (Critchley & Wallace, 2005).

Les niveaux de dose totale d'irradiation délivrée dans la sphère gynécologique sont variables en fonction de l'affection tumorale à traiter. Les ovaires reçoivent moins de 1 % de la dose totale lors d'une irradiation sus-diaphragmatique, environ 4 % lors d'une barre lombo-aortique ; par contre, ils

sont à l'intérieur des champs de radiothérapie pelvienne ou en Y inversé et ils reçoivent 10 à 12 Gy lors d'une irradiation corporelle totale (Letur-Konirsch *et al.*, 2005).

L'âge de la patiente, au moment du traitement, est capital. Avant 40 ans, une dose de 20 Gy induit une castration définitive alors qu'il suffit d'une dose de 6 Gy chez la femme plus âgée (de plus de 40 ans) (Lushbaugh & Casarett, 1976).

Le risque d'insuffisance ovarienne définitive augmente également avec la dose reçue. Une étude réalisée en 2005 montrait que toutes les patientes, âgées de moins de 30 ans, ayant reçu une irradiation > 15 Gy localisée sur les ovaires, développaient une insuffisance ovarienne prématurée (Schuck *et al.*, 2005).

La moitié de la population folliculaire serait détruite (LD50) pour une dose d'irradiation < 2 Gy (Critchley & Wallace, 2005).

Lors des traitements de tumeurs solides telles que le sarcome d'Ewing ou le rhabdomyosarcome..., les protocoles thérapeutiques incluent le plus souvent une irradiation abdominale et/ou pelvienne à la dose de 20 à 30 Gy. Or, une insuffisance ovarienne précoce a été retrouvée chez 97 % des femmes après une irradiation abdominale de 20 à 30 Gy pendant l'enfance (Critchley & Wallace, 2005).

Une autre étude réalisée sur 1581 femmes ayant présenté un cancer avant l'âge de 20 ans et ayant survécu au moins 5 ans après le diagnostic, a montré que les patientes qui avaient reçu une irradiation de moins de 20 Gy avaient un risque relatif d'insuffisance ovarienne précoce de 1.02 ; ce risque relatif atteignait 1.37 pour une dose de 20 à 35 Gy et 3.27 pour une exposition supérieure à 35 Gy (Chiarelli *et al.*, 1999).

Une étude rétrospective réalisée sur 3390 patientes survivantes de cancer, âgées de plus de 18 ans, mettait en évidence que 215 d'entre elles, soit 6.3 %, présentaient une insuffisance ovarienne prématurée. Ces patientes avaient le

plus souvent reçu une irradiation abdominale ou pelvienne et étaient plus âgées au moment du diagnostic par rapport aux patientes ne présentant pas d'insuffisance ovarienne.

Parmi les patientes présentant une insuffisance ovarienne prématurée, 54 % avaient reçu une irradiation d'au moins 10 Gy sur les ovaires (Chemaitilly *et al.*, 2006).

Le fractionnement des doses est moins toxique pour les ovaires ; en effet une irradiation corporelle totale à la dose de 10 Gy suffit à engendrer 55 % à 80 % d'insuffisance ovarienne précoce alors qu'un résultat similaire nécessiterait une dose > à 15 Gy si les doses sont fractionnées (Thibaud *et al.*, 1998).

L'irradiation abdominale, pelvienne, crâniospinale, mais également l'irradiation corporelle totale sont responsables d'une insuffisance ovarienne précoce.

L'effet des champs d'irradiation sur la fonction ovarienne a été étudiée sur une cohorte de 97 patientes traitées pour LAL par le même protocole de chimiothérapie d'induction suivi d'une radiothérapie. Une augmentation du taux de gonadotrophines (FSH, LH), associée à un retard pubertaire, a été observée chez 93 % des patientes ayant subi une irradiation abdominale associée à une irradiation crâniospinale, chez 49 % des patientes ayant reçu une irradiation crâniospinale seule et chez 9 % des patientes ayant reçu uniquement une irradiation du crâne avec une injection intrathécale de methotrexate (Hamre *et al.*, 1987).

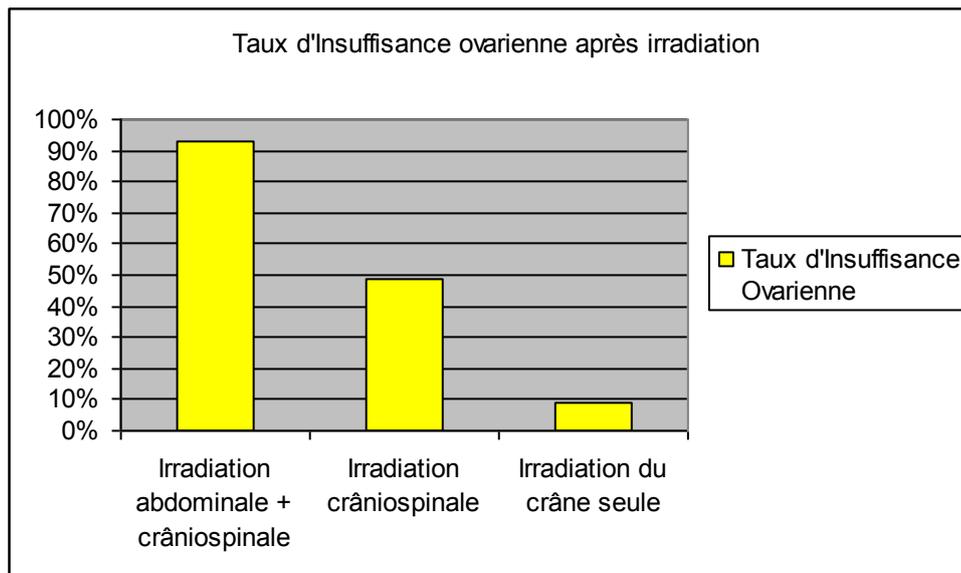


Figure 14 : Effet des champs d'irradiation sur la fonction ovarienne (Hamre et al., 1987).

L'effet gonadotoxique des rayons est surtout direct sur le tissu ovarien mais une irradiation massive de l'hypophyse peut entraîner un trouble de la sécrétion des gonadotrophines par lésion de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Critchley & Wallace, 2005).

Les effets de l'irradiation abdominopelvienne sur l'utérus sont également importants à prendre en considération.

Une irradiation incluant le pelvis déplete les ovaires en ovocytes comme dans un état pré ménopausique par vieillissement accéléré. De plus, les ovocytes restants sont au sein d'une fibrose ovarienne avec ischémie par sclérose vasculaire radio-induite. Ces éléments semblent être des facteurs aussi importants de cause de stérilité que l'apoptose ovocytaire.

L'utérus irradié présente également une nécrose puis une atrophie des glandes de l'épithélium endométrial (Letur-Konirsch et al., 2005).

Les altérations de l'utérus dépendent bien entendu de la dose totale d'irradiation et de la localisation de l'irradiation mais aussi de l'âge de la patiente au moment de l'irradiation.

Une femme jeune peut présenter un utérus normal asymptomatique en cas de faible dose d'irradiation jusqu'à un utérus de type pré pubère, voire un micro

utérus mal vascularisé avec un endomètre atrophique en cas d'irradiation > à 30 Gy (Letur-Konirsch *et al.*, 2005).

Larsen *et al.*, confirment par échographie la réduction du volume utérin à l'âge adulte chez les patientes ayant subi une radiothérapie dans l'enfance. En effet, ils retrouvent un volume utérin moyen de 13 mL après irradiation utérine directe alors qu'il est respectivement de 34 et 40 mL après irradiation sous-diaphragmatique n'incluant pas l'utérus et irradiation sus-diaphragmatique (Letur-Konirsch *et al.*, 2005) .

De la même façon, Critchley *et al.* démontrent qu'une irradiation pelvienne avant la puberté entraîne à l'âge adulte une diminution du volume utérin d'environ 40 % (Critchley & Wallace, 2005).

De plus, des altérations de l'endomètre et de la vascularisation utérine entraînent une augmentation du risque de complications obstétricales à type d'avortement spontané précoce, de retard de croissance intra utérin, d'accouchement prématuré (Critchley & Wallace, 2005).

Une étude sur l'issue de dons d'ovocyte chez 3 patientes survivantes de cancer, présentant une ménopause précoce après irradiation corporelle totale et greffe de moelle osseuse, a été réalisée en 2000 (Larsen *et al.*, 2000). La première patiente, traitée après la puberté et qui avait un utérus de volume normal, accoucha d'un enfant après 37 semaines de gestation ; la deuxième, traitée avant la puberté, avait un utérus de volume plus petit et fit une fausse couche au 2^{ème} trimestre ; la 3^{ème} patiente, traitée après la puberté, avait également un utérus de volume plus petit et ne présenta aucune grossesse jusqu'à ce jour.

Wallace a également rapporté le devenir de 6 grossesses chez 4 patientes antérieurement irradiées avec une dose totale de 22 à 30 Gy dans le pelvis. Il survient un arrêt de la grossesse au cours du 2^{ème} trimestre dans tous les cas, en particulier par non-distensibilité utérine (Letur-Konirsch *et al.*, 2005) .

Li a encore rapporté le devenir de 114 grossesses chez 60 patientes antérieurement irradiées pour néphroblastome. 30 % de ces grossesses (34 sur 114) ont eu une issue défavorable avec 17 mortalités périnatales et 17 accouchements prématurés. En comparaison avec des patientes de même âge non irradiées, on constate une augmentation de la mortalité périnatale et de la prématurité chez les patientes irradiées (Li *et al.*, 1987).

Cela nous montre bien l'impact des altérations de l'utérus sur les chances de grossesses futures.

Une hormonosubstitution est donc recommandée chez les jeunes patientes traitées par irradiation corporelle totale afin de favoriser le développement de l'utérus lors de l'adolescence.

Les séquelles gonadiques à long terme, actuellement observées après traitement anti-cancéreux, sont donc essentiellement imputables aux médicaments alkylants et à la radiothérapie sous-diaphragmatique.

III. Les stratégies de préservation de la fonction ovarienne lors d'un traitement gonadotoxique :

L'amélioration de la survie après un traitement anti-cancéreux chez des enfants, des adolescents et des adultes jeunes doit faire prendre en compte les effets secondaires à long terme de ces thérapeutiques. Parmi ceux-ci, les atteintes de la fertilité sont bien connues.

Lorsque la perte de la fonction ovarienne est inévitable, différentes solutions sont disponibles afin de préserver la fertilité.

A. Les traitements par agonistes de la GnRH :

Il est classique de penser que l'ovaire infantile est moins sensible à l'effet délétère de la radiochimiothérapie et que ceci serait lié à l'état de quiescence des follicules. C'est la raison pour laquelle la mise au repos des ovaires a été testée, chez le rat femelle, par Ataya en 1989 ; son étude a montré l'efficacité de cette protection par agonistes de la GnRH chez le rat. Cet effet protecteur serait du à l'inhibition, par les agonistes de la GnRH, de l'activité de mitoses ovariennes lors de leur administration (Ataya & Moghissi, 1989).

En 1995, Ataya a étudié l'efficacité d'une telle protection ovarienne chez le singe rhésus. Six femelles traitées par cyclophosphamide ont été divisées en 2 groupes, un groupe traité par agonistes de la LHRH en association au traitement par cyclophosphamide (groupe n°1) et un groupe traité par cyclophosphamide associé à un placebo (groupe n°2). A la fin du traitement, le groupe n°2 avait perdu 64.6 % des follicules primordiaux alors que le groupe n°1 n'avait perdu que 28.9 % des follicules primordiaux. Une protection ovarienne par agonistes de la GnRH a donc également été rapportée chez les singes rhésus (Ataya *et al.*, 1995b).

Puis l'équipe israélienne de Blumenfeld a étudié cette utilisation d'agonistes de la GnRH chez la jeune femme (Blumenfeld *et al.*, 1996). L'étude a permis de comparer une série de 20 femmes âgées de 15 à 40 ans présentant des cycles normaux avant traitement pour lymphome par chimiothérapie et recevant toutes une injection de Décapeptyl retard trimestrielle avant le début de la chimiothérapie, par rapport à un groupe témoin de femmes de même âge, présentant le même diagnostic, et traitées de la même manière mais sans blocage de l'axe hypothalamohypophyso-ovarien. Les auteurs ont retrouvé une différence significative quant à la reprise de cycles ovulatoires spontanés dans les 6 mois suivant la fin du traitement ; en effet 94 % des femmes traitées par l'association chimiothérapie et agonistes de la GnRH retrouvaient des menstruations spontanées dans les 6 mois après la fin du traitement contre 39 % dans le groupe témoin.

En 1999, Blumenfeld a de nouveau étudié l'intérêt d'un traitement par agonistes de la GnRH chez des patientes traitées par chimiothérapie pour maladie de Hodgkin ou pour lymphome non Hodgkinien. Il a retrouvé une fréquence de 4 % d'aménorrhée secondaire hypergonadotrope dans le groupe traité par agonistes de la GnRH contre 65 % dans le groupe traité uniquement par chimiothérapie (Blumenfeld *et al.*, 1999).

	Traitement par chimiothérapie + GnRH	Traitement par chimiothérapie seule
Nombre de patientes	28	40
Maladie de Hodgkin	18	26
Lymphome non Hodgkinien	10	14
Age	15-40	14-40
Insuffisance ovarienne prématurée	1/28 (4 %)	26/40 (65 %)

Tableau 4: Intérêt d'un traitement par agonistes de la GnRH (Blumenfeld *et al.*, 1999).

Une récente étude animale testant les effets, sur la fonction ovarienne, d'un antagoniste de la GnRH associé à un traitement par cyclophosphamide a montré que la protection par cet antagoniste était dose dépendante et qu'elle diminuait avec l'augmentation de la dose de cyclophosphamide (Meirow *et al.*, 2004).

Enfin, une étude réalisée chez l'homme en 2005 confirma à nouveau l'effet protecteur des agonistes de la GnRH sur la fonction ovarienne en cas de traitement par chimiothérapie (Marchesoni *et al.*, 2005). En effet, entre avril 1996 et mai 2002, Marchesoni *et al.* ont réalisé une étude portant sur 49 femmes atteintes de leucémies ou de lymphomes et traitées par chimiothérapie. Ils ont évalué la fonction ovarienne de ces patientes pendant une période d'observation de 41 mois après la fin du traitement. Ces patientes étaient divisées en 3 groupes : le groupe 1 avait reçu un traitement par agoniste de la GnRH pendant la chimiothérapie, le groupe 2 avait pris une contraception orale et le groupe 3 n'avait reçu aucun traitement adjuvant.

100 % des patientes du groupe 1 conservaient une fonction ovarienne normale à la fin de la période d'observation, versus 75 % des patientes du groupe 2 et 59 % des patientes du groupe 3. Cette étude montrait donc la présence d'une différence significative dans le maintien de la fonction ovarienne entre les

patientes bénéficiant d'un traitement adjuvant par agoniste de la GnRH et celles traitées par chimiothérapie seule.

Traitement	% patientes ayant une fonction ovarienne normale à la fin du traitement
Chimiothérapie + Agonistes GnRH	100
Chimiothérapie + contraception orale	75
Chimiothérapie seule	59

Tableau 5 : Effet protecteur des agonistes de la GnRH sur la fonction ovarienne en cas de traitement par chimiothérapie (Marchesoni *et al.*, 2005).

Cependant, d'autres travaux chez le rat montrent l'absence de protection par les agonistes de la GnRH en cas d'exposition à une irradiation ovarienne (Jarrell *et al.*, 1991).

En 1995, Ataya a évalué l'efficacité d'un agoniste de la GnRH chez des singes rhésus, les animaux étant irradiés au niveau des ovaires à la dose de 40 Gy à raison de 2 Gy /fraction. Le traitement était délivré avant, pendant et après l'irradiation. Aucune différence significative n'était notée lors de l'examen anatomo-pathologique des ovaires, par rapport au groupe contrôle, témoignant d'une inefficacité de ce traitement (Ataya *et al.*, 1995a).

Une telle protection ne peut donc pas être envisagée avant radiothérapie.

Même si l'efficacité de ce type de traitement est actuellement controversé, devant l'innocuité de l'injection mensuelle ou trimestrielle d'un agoniste retard de la GnRH, il apparaît licite de l'utiliser avant et pendant la chimiothérapie (Fenichel, 2005).

En 2007, Zuckerman a d'ailleurs annoncé la naissance d'une petite fille de 3 kg 450 chez une patiente traitée pour un lymphome quelques années auparavant. Cette patiente avait reçu de multiples cures de chimiothérapie ainsi qu'un traitement par greffe de moelle osseuse à 2 reprises. Elle avait également

bénéficié d'un traitement par agoniste de la GnRH avant et pendant ces différentes cures de chimiothérapie (Zuckerman, 2007).

B. Les traitements par inhibiteurs de l'apoptose :

Au cours de la vie fœtale mais également après la naissance, une très grande majorité des ovocytes présents dans les follicules dégénèrent par un processus classique d'apoptose.

De récentes données ont montré que certains sphingolipides seraient des médiateurs très importants de la croissance cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose au niveau de la gonade féminine (Revel & Laufer, 2002).

En effet, les progrès rapides dans la connaissance des acteurs moléculaires de l'apoptose, ont permis de mettre en évidence des facteurs ovocytaires impliqués de façon déterminante dans l'évolution de la réserve ovarienne. Parmi ceux-ci, on peut citer les métabolites des sphingolipides. De nombreux stimuli (facteurs de croissance, cytokines, irradiation, chimiothérapie...) induisent au niveau cellulaire la formation de céramides par hydrolyse de la sphingomyéline membranaire sous l'action d'une sphingomyélinase. Les céramides produits peuvent initier l'apoptose par divers mécanismes, mais donnent aussi naissance à un métabolite, le sphingosine-1-phosphate (S1P), dont l'action est anti-apoptotique (Monniaux, 2002).

Le traitement par sphingosine-1-phosphate (S1P) permettrait de préserver les patientes, traitées pour cancer, de l'insuffisance ovarienne prématurée (Morita *et al.*, 2000).

En effet, une étude a montré qu'une simple injection de S1P dans la bourse ovarienne d'une souris 2 heures avant irradiation permettait d'empêcher la réduction du pool de follicules immatures.

De plus une autre étude a mis en évidence que le traitement par S1P permettait de rendre les ovocytes de souris résistants à l'action de la doxorubicine, drogue utilisée couramment en chimiothérapie (Perez *et al.*, 1997).

Ces résultats ouvrent donc des perspectives thérapeutiques intéressantes pour contrebalancer au niveau ovarien les effets délétères des traitements anticancéreux.

En effet, l'administration de S1P, ou celle d'inhibiteurs de l'expression de facteurs pro-apoptotiques (tels que Bax), pourrait permettre de contrebalancer l'effet destructeur d'une irradiation ou d'une chimiothérapie lors de thérapies anticancéreuses (Monniaux, 2002).

C. La transposition ovarienne :

Avant le début d'une radiothérapie pelvienne, il est possible de proposer une transposition ovarienne ou ovariopexie. Cette technique consiste à déplacer l'ovaire à distance de la zone d'irradiation tout en préservant l'un de ses pédicules vasculaires. Il peut s'agir d'une transposition ovarienne latérale, dans les gouttières pariéto-coliques ou d'une transposition ovarienne sur la ligne médiane, en arrière de l'utérus. Le choix entre ces deux techniques dépend de l'expérience du chirurgien, du champ d'irradiation et de l'anatomie de la patiente.

En 1992, Thibaud *et al.* rapportaient l'intérêt d'effectuer une transposition ovarienne avant le début de la radiothérapie lors des cancers de l'enfant (maladie de Hodgkin, sarcome d'Ewing, medulloblastome...) (Thibaud *et al.*, 1992).

L'irradiation pelvienne peut être responsable d'une insuffisance ovarienne prématurée dès que la dose d'irradiation délivrée sur les ovaires est > 3 Gy (Husseinzadeh *et al.*, 1984). Or, les patientes atteintes d'une maladie de Hodgkin reçoivent en général une dose totale d'irradiation pelvienne d'environ 20 à 40 Gy, ce qui provoque inévitablement chez ces patientes une insuffisance ovarienne prématurée en l'absence de traitement préventif. En 1999, Williams réalisa une étude rétrospective chez dix patientes atteintes de maladie de Hodgkin et ayant bénéficié d'une transposition ovarienne avant le traitement par radiothérapie. Cinq de ces patientes, qui avaient reçu au maximum 2 cures de chimiothérapie, ont conservé une fonction ovarienne normale à la fin du traitement. Les cinq autres patientes ont présenté une insuffisance ovarienne prématurée mais celles-

ci avaient reçu de multiples cures de chimiothérapie en association à la radiothérapie. Cette étude nous montre bien l'intérêt d'effectuer une transposition ovarienne avant le traitement par radiothérapie essentiellement lorsque celui-ci n'est pas associé à de multiples cures de chimiothérapie (Williams *et al.*, 1999). La transposition ovarienne donne, en effet, de très médiocres résultats dans les situations où une chimiothérapie est associée à la radiothérapie, ce phénomène n'étant pas surprenant car la transposition n'a pas d'action préventive contre la chimiothérapie.

La transposition ovarienne permet de réduire les effets de l'irradiation sur l'ovaire mais elle ne protège pas l'ovaire de manière absolue. Cela a été démontré lors d'une étude sur la fonction ovarienne après transposition ovarienne bilatérale pour cancer du col. En effet, le suivi de 95 patientes a montré que la fonction ovarienne était préservée dans 100 % des cas en cas de traitement chirurgical seul ; elle n'était préservée que dans 90 % des cas en cas de curiethérapie vaginale post-opératoire et que dans 60 % des cas en cas de radiothérapie externe post-opératoire associée à la curiethérapie vaginale (Morice *et al.*, 2000).

De plus, il est important de noter que la transposition ovarienne peut être responsable de pathologies des ovaires transposés ; l'apparition de kystes ovariens et de lésions vasculaires est en effet rapportée dans plusieurs études (Kim, 2006) .

Ainsi cette technique reste limitée aux jeunes patientes atteintes de cancer et traitées uniquement par radiothérapie (Kim, 2006).

D. La cryopréservation embryonnaire :

La congélation embryonnaire permet de conserver des embryons pendant une période prolongée, afin de préserver la fertilité d'un couple dont la conjointe est concernée par un traitement éventuellement stérilisant. Elle est disponible dans l'espèce humaine depuis plus de 20 ans et donne des résultats fiables.

Cette technique implique la réalisation d'une fécondation *in vitro* (FIV). Une stimulation ovarienne multifolliculaire est nécessaire chez la femme permettant l'obtention de plusieurs follicules. Les ovocytes obtenus seront fécondés avec les spermatozoïdes du conjoint afin d'obtenir des embryons qui seront congelés.

Dans le cadre d'une conservation des embryons avant traitement d'un cancer, il est habituel de congeler la totalité des embryons, en informant le couple du risque de pertes embryonnaires, la résistance des embryons au processus de congélation-décongélation dépendant de leur qualité.

Les embryons pourront être congelés à différents stades : le stade zygote, le stade d'embryon précoce (stade J2/J3), ou le stade de blastocyste. La congélation au stade d'embryon précoce, après 2 à 3 jours de culture *in vitro*, est la solution la plus fréquemment choisie par les équipes et celle réalisée majoritairement en France.

Certaines études rapportent de meilleurs résultats en terme de survie embryonnaire et également en terme de taux de grossesse avec la congélation au stade d'embryon précoce. En effet, en 1999, une étude retrouvait 73.9 % de survie embryonnaire après congélation au stade d'embryon précoce versus 65 % au stade zygote ; de plus les résultats en terme de taux de grossesse étaient également meilleurs avec les embryons précoces (22.8 %) par rapport au stade zygote (14.8 %) (Kattera *et al.*, 1999). Cependant d'autres études montrent des résultats contradictoires (Senn *et al.*, 2000).

Enfin, les embryons peuvent être congelés après avoir été cultivés dans des milieux séquentiels permettant le développement embryonnaire jusqu'au stade de blastocyste (J5-J6).

Différentes techniques de congélation embryonnaire existent actuellement ; on peut en effet proposer un protocole de congélation lente ou une technique de vitrification essentiellement réservée à la congélation embryonnaire au stade de blastocyste. Cette technique de vitrification n'est, cependant, pas encore autorisée en France.

Devant la nécessité de réaliser à la fois une stimulation ovarienne, une ponction ovocytaire et une fécondation in vitro, cette technique demande obligatoirement un traitement de plusieurs semaines. En effet un seul cycle de stimulation permet de congeler en général 6 à 7 embryons ce qui donne des chances limitées de grossesse après transfert embryonnaire (Olivennes & Aubard, 2002). Pour augmenter le nombre d'embryons congelés, il faudrait pouvoir réaliser chez la patiente plusieurs cycles de stimulation ovarienne ce qui nécessiterait de retarder le traitement anti-cancéreux. Cette technique n'est donc pas toujours possible et peut même être risquée lorsque le traitement anti-cancéreux est urgent ; de plus, elle ne peut pas être envisagée dans les cas de cancers avec récepteurs hormonaux.

Enfin, cette technique est également impossible chez la femme n'ayant pas de partenaire et, à fortiori, chez les très jeunes patientes (Kim, 2006). En effet, la loi de bioéthique de 2004 impose le consentement des 2 conjoints avant la réalisation de la congélation embryonnaire ; de plus l'homme et la femme demandant cette assistance médicale à la procréation doivent être mariés ou en mesure d'apporter la preuve d'une vie commune d'au moins deux ans .

E. La cryopréservation ovocytaire :

La congélation d'ovocytes matures (en métaphase II) est une alternative à la congélation embryonnaire ; de plus elle présente moins de problèmes éthiques.

Cette méthode présente un intérêt médical évident chez les femmes jeunes nécessitant un traitement anti-cancéreux toxique pour l'ovaire. Elle nécessite par contre toujours la mise en place d'une stimulation de l'ovulation et une ponction, retardant ainsi le début des traitements par chimio- ou radiothérapie, ce qui peut être préjudiciable pour les patientes (Kim, 2006).

Depuis le premier cas de grossesse après congélation-décongélation d'ovocytes humains en 1986 (Chen, 1986), plus de 100 bébés sont nés grâce à

cette technique à ce jour. Cependant, le taux de grossesse reste nettement plus bas avec cette technique par rapport à la congélation embryonnaire. En effet, l'ovocyte est une cellule grande et fragile, ce qui pose des problèmes en terme de cryopréservation. Différentes altérations de l'ovocyte mature sont causées par la congélation du fait de l'extrême sensibilité des ovocytes aux variations de température et aux agents cryoprotecteurs (Kim, 2006). On note par exemple des altérations du fuseau méiotique, des granules corticaux et des altérations de la zone pellucide à type de durcissement. En effet, l'exposition des ovocytes en métaphase II aux cryoprotecteurs et aux cycles de congélation/décongélation entraîne une désorganisation du fuseau méiotique par dépolymérisation des microtubules provoquant un risque d'aneuploïdie. Par ailleurs, la congélation altérerait la structure même des granules corticaux, ce qui conduit au moment de la fécondation à une absence ou à une réaction corticale anormale ayant pour conséquence une augmentation de la polyspermie et donc de la polyploïdie embryonnaire. En ce qui concerne le durcissement de la zone pellucide, ce problème peut être contourné en utilisant une technique de FIV avec injection intracytoplasmique des spermatozoïdes (ICSI).

Différents protocoles de congélation des ovocytes matures existent . On peut en effet utiliser un protocole de congélation lente permettant un taux de survie après décongélation de 60 % en moyenne (Fabbri *et al.*, 1998) ou un protocole de vitrification. Yoon *et al.* ont rapporté l'obtention d'un taux de survie de 69% grâce à la vitrification d'ovocytes matures lors d'une étude réalisée en 2003 (Yoon *et al.*, 2003).

Ces techniques nécessitent cependant encore des études complémentaires afin de perfectionner les différents protocoles de congélation ; elles ne sont donc pas encore utilisées en routine en France.

La congélation d'ovocytes peut s'effectuer également au stade d'ovocytes immatures. L'intérêt de ce type de congélation est d'éviter les risques liés aux dommages du fuseau méiotique observés lors de la congélation d'ovocytes matures. De plus, cela présente l'avantage de pouvoir recueillir les ovocytes en cycle spontané. En revanche, cela nécessite une maturation in vitro de l'ovocyte,

technique qui n'est actuellement pas parfaitement maîtrisée. Les techniques de congélation d'ovocytes immatures restent donc pour l'instant moins performantes que celles intéressants les ovocytes en métaphase II.

Une stratégie de préservation des gamètes à proposer chez des petites filles pré pubères ou des jeunes femmes sans partenaire est donc la conservation du tissu ovarien.

IV. La cryopréservation du tissu ovarien :

La congélation de cortex ovarien est une alternative à la congélation ovocytaire dont le but est de constituer une réserve de gamètes féminins immatures, afin de préserver la fertilité ultérieure de femmes jeunes ou de petites filles devant bénéficier d'un traitement potentiellement stérilisant.

A. Principes généraux de cryobiologie : ***(<http://www.cryobiosystem-imv.com>)***

1. Généralités sur les effets des basses températures sur les systèmes biologiques :

D'une manière générale, le problème de la conservation des tissus est celui du blocage ou tout au moins du ralentissement des fonctions cellulaires et de la conservation des structures physicochimiques qui conditionnent ces fonctions.

Le froid ralentit les réactions enzymatiques intervenant dans les métabolismes biochimiques cellulaires. Par exemple, une réaction qui dure une seconde à 27 °C durerait près de 4 secondes à 4 °C et 2×10^6 années à -170 °C. Ainsi, en refroidissant la température d'un système biologique jusqu'à la température de l'azote liquide (- 196 °C), le « cours du temps biologique » est pratiquement interrompu.

Il faut cependant éviter les altérations cellulaires liées au froid.

2. La congélation de l'eau pure :

Les systèmes biologiques sont composés en moyenne de 60 à 80 % d'eau. L'eau existe sous 3 formes : vapeur, liquide et solide.

Le passage de la phase liquide à la phase solide se produit à partir des centres germinatifs de cristallisation à une température dite de surfusion située, pour l'eau pure, entre 0 et -4°C . Cette température correspond à une zone d'agitation moléculaire très importante où l'eau pure se transforme brutalement en glace avec libération de chaleur. Cette réaction exothermique entraîne une remontée de la température à 0°C qui est la température de congélation de l'eau. On observe alors un front de glace en remaniement constant dû à la formation et à l'agglutination des cristaux.

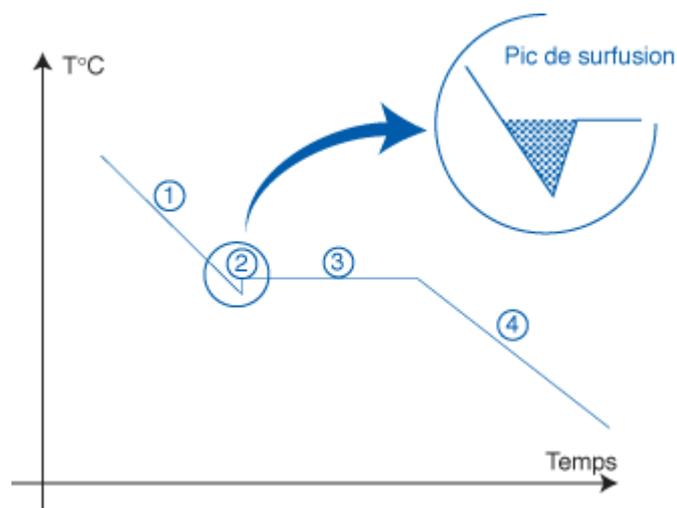


Figure 15: Histoire thermique (Cryo Bio System).

En fonction de la vitesse de refroidissement, l'eau en phase solide peut prendre 2 formes qui vont occuper des volumes différents :

- si la vitesse de congélation est relativement lente, on obtient un cristal de glace occupant un volume supérieur à celui de la phase liquide ;
- si la vitesse de congélation est plus rapide, le volume reste identique à celui de la phase liquide; c'est la vitrification. (Vitesse $> 10\,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

3. La congélation des solutions salines :

Le point de surfusion des sels est atteint après celui de l'eau pure, vers -10°C. Les sels vont donc se trouver dans un volume de plus en plus réduit et leur concentration va donc augmenter progressivement au cours du refroidissement. Cela va entraîner des modifications importantes de la pression osmotique du milieu ainsi que du pH, c'est ce que l'on appelle « l'effet solution ».

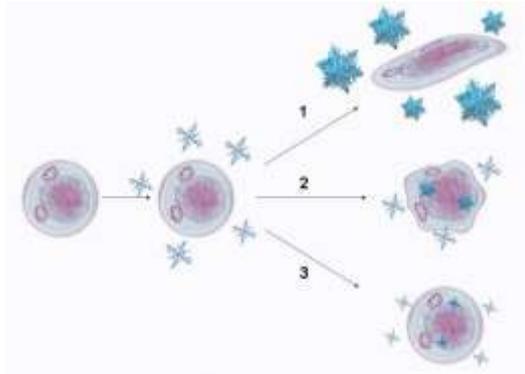
4. La congélation des cellules :

Lorsque des cellules sont présentes dans le milieu, l'augmentation de la pression osmotique due à l'effet solution est responsable d'une sortie d'eau intracellulaire et donc d'une déshydratation passive de la cellule avec réduction de son volume.

Pour chaque type cellulaire, il existe une limite de déshydratation au-delà de laquelle se produit une altération irréversible des structures cellulaires. En effet, si cette déshydratation contribue à maintenir l'équilibre ionique de part et d'autre de la membrane plasmique, elle doit cependant rester inférieure à 50-60 % du volume initial afin d'éviter des lésions trop importantes du cytosquelette et la mort cellulaire.

L'augmentation de la concentration en sels observée au cours de la cristallisation de l'eau provoque la précipitation des protéines et l'altération des complexes lipoprotéiques formant la membrane. De plus, la cristallisation des sels tampons peut entraîner des variations importantes du pH et par suite une dénaturation irréversible des protéines. L'augmentation de la concentration de certaines molécules ou ions peut encore provoquer une toxicité cellulaire.

5. Vitesse de refroidissement :



- 1 : refroidissement lent
- 2 : refroidissement rapide
- 3 : refroidissement très rapide

Figure 16: Effets de la vitesse de refroidissement sur la cristallisation intra et extra cellulaire (Cryo Bio System).

A la dimension des vitesses de refroidissement utilisées en pratique courante, la cristallisation débute invariablement dans le milieu extracellulaire. L'équilibre osmotique de la cellule étant perturbé, celle-ci se déshydrate partiellement.

Si la vitesse de congélation est trop lente, la formation de cristaux de glace à l'extérieur de la cellule va être importante, entraînant une forte hyperosmolarité extracellulaire, une déshydratation excessive de la cellule avec une augmentation de la pression osmotique intracellulaire et la mort cellulaire.

Si la vitesse de congélation est trop rapide, la cellule n'a pas le temps de se déshydrater avant la formation du cristal de glace intracellulaire ; celui-ci va donc être très important, d'où une augmentation du volume de la cellule avec des altérations des structures cytoplasmiques et membranaires entraînant également la mort de la cellule.

Il est possible de déterminer, pour un type de cellule donné, une zone de vitesse de refroidissement pour laquelle le taux de survie sera maximum. Il s'agit du « pic de survie ». C'est le compromis entre les vitesses lentes de refroidissement qui provoquent la contraction des cellules et les vitesses rapides qui entraînent la formation de glace intracellulaire.

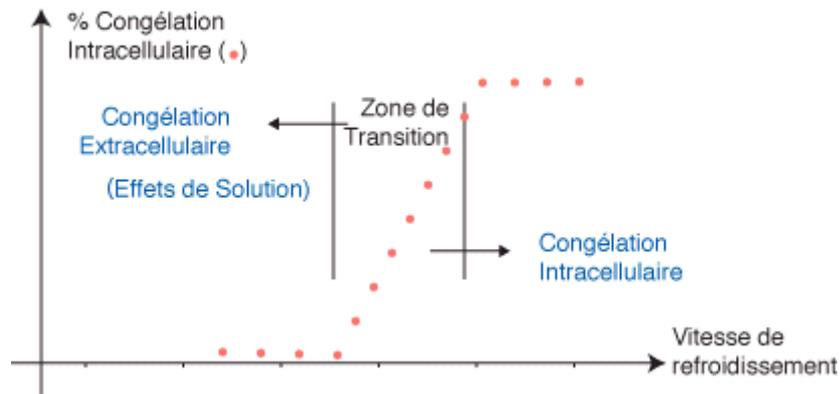


Figure 17 : Nature des lésions dues à la congélation (Cryo Bio System).

Afin de réduire la taille des cristaux de glace, on ajoute au milieu de congélation des cryoprotecteurs.

6. Les agents cryoprotecteurs :

a) Propriétés :

Les cryoprotecteurs sont des composés chimiques naturels ou de synthèse dont le but est de protéger les cellules des effets délétères des très basses températures. Leur action est remarquable du fait de leurs propriétés physico-chimiques : les cryoprotecteurs abaissent le point de congélation des solutions extracellulaires au fur et à mesure que leur concentration augmente. En abaissant ce point de congélation, ils ralentissent la cinétique de sortie d'eau intracellulaire et évitent ainsi à la cellule d'atteindre son volume minimal critique ; ils évitent donc les hyper concentrations salines et les précipitations.

De plus, grâce à leur grande affinité avec l'eau, les cryoprotecteurs interfèrent avec le processus de croissance des cristaux de glace. En effet, ces agents contiennent des groupements électronégatifs capables de former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. Ainsi, si les molécules d'eau sont fortement liées au cryoprotecteur, leur mobilité diminue et la viscosité de la solution augmente, avec comme conséquence une diminution du taux de cristallisation.

On distingue deux catégories de cryoprotecteurs :

✓ Les cryoprotecteurs intracellulaires dits pénétrants :

Ce sont des substances organiques très solubles et de petit poids moléculaire (PM < 400). Ces cryoprotecteurs, en pénétrant à l'intérieur des cellules, augmentent la concentration des solutés intracellulaires afin de diminuer la formation de cristaux à l'intérieur de la cellule.

Les cryoprotecteurs pénétrants les plus utilisés en médecine de la reproduction sont :

- Le diméthyl sulphoxide (DMSO) : c'est un solvant des corps gras de faible poids moléculaire (PM= 78) qui traverse rapidement les membranes cellulaires, avec en contre partie une toxicité cellulaire importante.
- Le 1,2 propanediol ou propylène glycol (PROH) : c'est un dialcool (PM = 76) pénétrant rapidement les membranes cellulaires et d'une grande stabilité à l'état amorphe.
- L'éthylène glycol (EG) : c'est un dialcool (PM = 62) diffusant rapidement dans la cellule
- Le glycérol (PM = 92)

✓ Les cryoprotecteurs extracellulaires dits non pénétrants : PM > 10 000

Ce sont des sucres ou des polymères de haut poids moléculaire. Ils ne pénètrent pas dans les cellules et sont utilisés en combinaison avec les cryoprotecteurs intracellulaires.

Les sucres de haut poids moléculaire comme les disaccharides (sucrose, tréhalose) améliorent la déshydratation cellulaire en entraînant une hyper-osmolarité extra-cellulaire et diminuent les risques de cristallisation.

Les polymères les plus utilisées sont le polyvinylpyrrolidone (PVP), le polyéthylène glycol (PEG), le ficoll et le dextran.

b) Toxicité des cryoprotecteurs :

L'effet dose-dépendant des cryoprotecteurs est limité par leur toxicité qui doit rester tolérable pour les cellules. Cette toxicité dépend de la concentration en cryoprotecteurs, mais aussi de la température et de la durée d'exposition.

B. Historique de la cryoconservation ovarienne :

Les premiers travaux en matière de congélation de tissu ovarien remontent aux années 1950. A cette époque, les premières congélations de tissu ovarien de souris à -79°C permettaient d'obtenir un taux de survie des follicules primordiaux de 5 % (Green *et al.*, 1956). Malgré ce faible taux de survie, cette technique avait permis à Parrott d'obtenir la première grossesse, à partir de tissu ovarien congelé, chez la souris en 1960.

Puis, pendant plus de trente ans, aucune publication de tentative de congélation de tissu ovarien n'a été faite. Cela peut s'expliquer par le fait que cette technique était peu rentable puisqu'une très large majorité des follicules étaient détruits par congélation ; de plus, à cette époque, la fertilité des patientes passait largement au second plan après la gravité de la maladie néoplasique. Ce sont donc les progrès de la cancérologie qui ont fait renaître un intérêt pour la congélation ovarienne.

C'est surtout à partir des années 1990 que de nombreux travaux concernant la congélation d'ovaire ont été publiés.

En 1990, Carroll démontre que des follicules primaires de souris congelés en présence d'un cryoprotecteur tel que le DMSO peuvent récupérer une folliculogénèse normale après décongélation (Carroll *et al.*, 1990).

En 1993, Carroll et son équipe obtiennent la naissance de souriceaux après congélation-décongélation de follicules isolés (Carroll & Gosden, 1993).

En 1994, l'équipe de Gosden obtient une naissance chez la brebis après greffe orthotopique de tissu ovarien ; l'expérience consistait à congeler, dans de l'azote liquide contenant un cryoprotecteur, des coupes de la corticale d'ovaires de brebis puis à replacer ces coupes chez l'animal après décongélation. Après accouplement, une brebis a obtenu une grossesse à terme (Gosden *et al.*, 1994).

En 1996, Aubard et son équipe obtiennent plusieurs grossesses après autogreffe orthotopique de tissu ovarien congelé chez des rates irradiées (Aubard *et al.*, 1996).

En 2001, la restauration d'une folliculogénèse et d'une régulation hormonale dans l'espèce humaine, après transplantation de tissu ovarien cryoconservé, sont décrites. En effet , une congélation de cortex ovarien avait été réalisée chez une patiente de 36 ans présentant une maladie de Hodgkin avant la mise en route de la chimiothérapie ; 19 mois plus tard, la patiente présentant une insuffisance ovarienne prématurée, une greffe orthotopique de cortex ovarien fut réalisée ; 7 mois après cette greffe, on assistait à une augmentation du taux d'oestradiol et à une diminution des taux de FSH et de LH (Radford *et al.*, 2001).

L'obtention d'un embryon *in vitro* après autoconservation de tissu ovarien est décrite en 2004 par l'équipe d'Oktay . Une patiente, âgée de trente ans et présentant un cancer du sein, avait bénéficié d'une congélation de tissu ovarien avant l'administration d'une chimiothérapie à forte dose par cyclophosphamide ; cette chimiothérapie avait entraîné une insuffisance ovarienne précoce ; les fragments de cortex ovarien ont été greffés 6 ans plus tard sous la peau de la paroi abdominale de cette patiente ; trois mois après cette greffe hétérotopique, on a pu observer la restauration de la fonction ovarienne avec la production d'œstrogènes et le développement de follicules ; 20 ovocytes ont été retrouvés après stimulation ovarienne classique et un a permis le développement d'un embryon à 4 cellules après réalisation d'une maturation *in vitro* et d'une FIV (Oktay *et al.*, 2004).

C'est l'équipe belge du Professeur Donnez qui a annoncé en septembre 2004 la première naissance humaine après autoconservation ovarienne (Donnez *et al.*, 2004). En effet, une autoconservation ovarienne avait été réalisée en 1997 chez une patiente de 25 ans atteinte d'une maladie de Hodgkin avant le début de son traitement par chimioradiothérapie. Lors de son traitement, la patiente avait présenté un tableau d'insuffisance ovarienne prématurée, objectivée par un taux de FSH à 91 mUI/mL et un taux de LH à 85 mUI/mL. Sept ans plus tard, une greffe orthotopique était réalisée sous coelioscopie en plaçant des fragments de cortex ovarien au niveau d'une fenêtre péritonéale sur le hile de l'ovaire droit. Cinq mois après la greffe, on observait la restauration de cycles menstruels. Une grossesse spontanée est ensuite survenue onze mois après cette greffe, avec naissance à 37 SA d'une petite fille de 3720 g.

Une deuxième naissance a été rapportée au mois de juillet 2005 par Meiorow *et al.* chez une jeune femme de 28 ans castrée après traitement d'un lymphome non Hodgkinien par une chimiothérapie à forte dose. Après 2 ans de rémission, elle a bénéficié d'une greffe orthotopique de tissu ovarien, qui avait été cryoconservé après deux lignes de chimiothérapie. Huit mois après la greffe, la patiente a récupéré un cycle menstruel spontané et la grossesse a été obtenue au cours du cycle suivant par fécondation *in vitro* (Meiorow *et al.*, 2005).

Une autre grossesse a ensuite été décrite par le Dr Demeestere après greffe hétérotopique et orthotopique de tissu ovarien congelé. En effet, une jeune femme traitée par chimiothérapie pour une maladie de Hodgkin depuis l'âge de 24 ans avait subi une autogreffe de moelle osseuse en novembre 2000. Après l'autogreffe, la patiente était en rémission complète mais elle n'avait pas retrouvé pas de cycles menstruels. Quatre ans après l'autogreffe de moelle osseuse, elle a bénéficié d'une greffe de tissu ovarien qui avait été cryopreservé après une seule cure de chimiothérapie. La greffe de tissu ovarien était réalisée en 3 endroits : 3 fragments étaient greffés au niveau de l'ovaire controlatéral, 9 au niveau du sac péritonéal et 6, en sous cutané, au niveau abdominal. 148 jours après la transplantation, la patiente a récupéré des cycles menstruels ; des follicules se développaient dans les 3 sites de greffe. En Août 2005, une

grossesse spontanée était objectivée par l'augmentation de la β hCG. Malheureusement, cette patiente a présenté une fausse couche après 7 semaines de gestation. L'analyse cytogénétique du produit d'avortement a révélé une aneuploïdie, à type de triploïdie associée à une tétrasomie du chromosome 10 (Demeestere *et al.*, 2006).

Un an après la greffe de tissu ovarien, la patiente présentait à nouveau un tableau d'insuffisance ovarienne objectivé par une augmentation du taux de FSH et une diminution du taux d'inhibine B. Une seconde greffe était alors réalisée en deux endroits: 2 fragments étaient greffés au niveau de l'ovaire controlatéral et 6 en sous cutané au niveau abdominal. Cinq mois après cette deuxième greffe, deux follicules de 15 mm étaient observés au niveau du site ovarien et une grossesse spontanée était mise en évidence par un dosage de β HCG 14 jours après. Cette grossesse est toujours en cours actuellement (Demeestere, 2007).

C. Les modalités de la congélation du tissu ovarien :

1. Le prélèvement :

Le prélèvement ovarien peut être réalisé par coelioscopie ou par laparotomie.

La coelioscopie est un moyen idéal pour prélever la quantité désirée de tissu ovarien avec un minimum d'altération de l'appareil génital (Olivennes & Aubard, 2002).

La laparotomie reste toujours une alternative possible, essentiellement lorsqu'une intervention chirurgicale abdominale est prévue dans le cadre de la thérapeutique.

Ce prélèvement intéresse un ovaire entier ou un fragment d'ovaire uniquement. Si l'ovaire entier est prélevé, il est préférable d'éviter l'électrocoagulation à proximité du cortex, qui pourrait détruire des follicules. Si l'on ne désire que des biopsies de cortex ovarien, Meirou a décrit un appareil permettant de réaliser des biopsies de 5 mm de diamètre sur 2 à 3 mm de

profondeur, utilisable en coelioscopie après introduction par un trocart de 5 mm (Olivennes & Aubard, 2002).

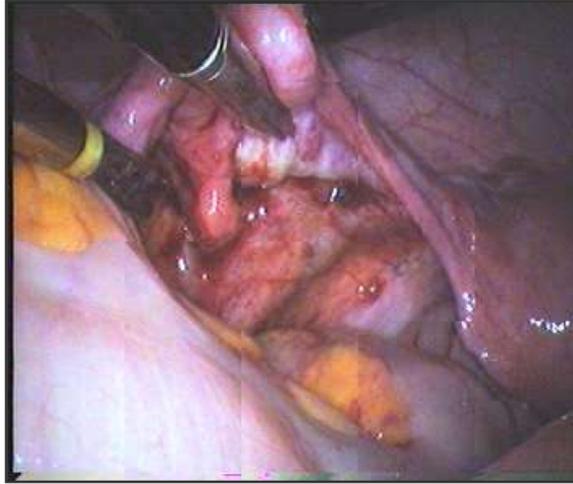


Figure 18 : Ovariectomie par coelioscopie.

Dès que le prélèvement est réalisé, l'ovaire est placé dans un milieu de culture, le milieu de Leibovitz, et acheminé au laboratoire.

2. La préparation des fragments ovariens :

Les ovocytes immatures sont en grand nombre dans le cortex ovarien, ce qui incite à penser que la congélation de cortex ovarien serait la technique ayant le plus grand potentiel en terme de résultat (Poirot *et al.*, 2002).

L'ovaire est donc disséqué afin d'éliminer la médullaire ; puis la corticale est coupée en fragments de 1 mm d'épaisseur et de taille variable (1cm² et 1 mm²) ; la surface optimale des fragments n'étant pas encore déterminée avec exactitude.



Figure 19 : Prélèvements de cortex ovarien.

Les fragments ovariens sont ensuite placés dans la solution de congélation contenant le cryoprotecteur ; Newton a démontré en 1998 que la meilleure méthode de préparation du tissu ovarien à la congélation, était de le placer dans la solution de congélation sous agitation pendant 30 minutes à 4 °C afin d'optimiser la pénétration du cryoprotecteur (Newton *et al.*, 1998).

La période qui sépare la dévascularisation du tissu ovarien lors du prélèvement, du moment où le tissu sera congelé, est appelé « ischémie chaude ». Cette période doit être réduite au minimum car c'est le moment où se produisent les altérations tissulaires qui seront responsables, lors de la reperfusion, de la production de radicaux libres. Cette période ne doit donc pas dépasser les 30 minutes.

3. La congélation des fragments ovariens :

La cryopréservation du tissu ovarien est une technique permettant de conserver un contingent important de follicules primordiaux, moins cryosensibles que les follicules en phase de croissance. Ceux - ci sont en effet moins sensibles à la congélation du fait de leur plus petite taille et de leur plus faible activité métabolique. De plus le rapport surface/volume élevé, dû à la petite taille de l'ovocyte, réduit les problèmes associés aux mouvements de l'eau et des cryoprotecteurs dans la cellule au cours de la congélation (Shaw *et al.*, 2000).

Toute la difficulté sera ensuite d'obtenir des ovocytes matures à partir de follicules primordiaux.

a) Choix du cryoprotecteur :

La réussite de la congélation du cortex ovarien repose principalement sur l'utilisation d'une solution cryoprotectrice adaptée. Les cryoprotecteurs les plus utilisés en médecine de la reproduction sont :

- le diméthyl sulphoxide (DMSO)
- le 1,2 propanediol ou propylène glycol (PROH)
- l'éthylène glycol (EG)
- le glycérol

Les premiers travaux de congélation ovarienne avaient été menés avec le seul cryoprotecteur disponible à l'époque qui était le glycérol. Les résultats étaient assez mauvais puisque seuls 5 % des follicules primordiaux survivaient à la congélation chez le rat (Green *et al.*, 1956).

Afin de choisir lequel de ces cryoprotecteurs utiliser dans le protocole de congélation de tissu ovarien, Newton a comparé, en 1996, la survie des follicules primordiaux humains après congélation avec divers cryoprotecteurs puis greffe à des souris immunodéficientes. Les taux de survie des follicules primordiaux étaient identiques pour le DMSO et l'éthylène glycol (voisins de 80 %) ; ils étaient un peu plus faibles, sans différence significative, pour le propanediol ; par contre, ils étaient beaucoup moins bons pour le glycérol (seulement de 10 %) (Newton *et al.*, 1996).

	TISSU FRAIS	DMSO	ETHYLENE GLYCOL	PROPANEDIOL	GLYCEROL
% DE SURVIE DES FOLLICULES PRIMORDIAUX	100	74	84	44	10

Tableau 6 : Survie des follicules primordiaux humains après congélation avec divers cryoprotecteurs (Newton *et al.*, 1996).

Les nombreux essais de cryoconservation réalisés chez la brebis (Demirci *et al.*, 2001), la vache (Lucci *et al.*, 2004) et la femme (Hovatta, 2000) donnent les résultats les plus satisfaisants, en terme de viabilité et/ou de morphologie folliculaire, en utilisant le DMSO ou le PROH comme cryoprotecteur.

Une étude réalisée en 2003 a montré l'absence de différence histologique et immuno-histochimique avant et après congélation-décongélation du tissu ovarien en utilisant le PROH comme cryoprotecteur associé au sucrose (Fabbri *et al.*, 2003).

Enfin, les effets de deux cryoprotecteurs (DMSO et PROH), utilisés à deux concentrations (1.5 et 2 M), sur la morphologie des petits follicules du cortex ovarien de lapine ont été comparés lors d'une étude réalisée en 2005. Les résultats de cette étude suggèrent que le PROH est un cryoprotecteur plus efficace que le DMSO pour la congélation du cortex ovarien de la lapine (Neto *et al.*, 2005).

b) Congélation lente du tissu ovarien :

Pendant les années 1950 – 1960, les travaux de plusieurs auteurs anglais ont permis d'établir les principes fondamentaux de la congélation ovarienne tels qu'ils sont encore appliqués de nos jours (Olivennes & Aubard, 2002) :

- la présence d'un cryoprotecteur est obligatoire
- la descente en congélation doit être lente (« slow cooling »)
- tous les follicules matures ou en croissance sont détruits par la congélation

- la décongélation doit être au contraire rapide et la greffe réalisée immédiatement après car le tissu ovarien décongelé s'altère très vite

Depuis les années 1960, la cryobiologie s'est développée avec la découverte de nouvelles substances cryoprotectrices et l'apparition de congélateurs automatiques programmables.

En 1990, Gosden propose une courbe de descente en température faite de plusieurs paliers ; les tubes ou les paillettes contenant les greffons sont mis dans un congélateur programmable dont la température de départ se situe vers 5 °C. La descente est alors de 2°C/min jusqu'à - 9°C puis un seeding, c'est à dire une induction de la cristallisation, est réalisé soit manuellement, soit automatiquement, puis la descente est reprise à 0.3°C/min jusqu'à - 40°C. Ensuite, la vitesse de descente en température est accélérée à 10°C/min jusqu'à -140 °C. Les tubes sont alors retirés du congélateur et stockés dans l'azote liquide (Gosden, 1990).

En 1999, Gook compare différents protocoles de congélation de tissu ovarien humain utilisant le PROH comme cryoprotecteur associé au sucrose (comparaison de différentes pentes de descente en température, de différents temps de déshydratation...); il confirme grâce à cette étude la supériorité des protocoles de « slow cooling » par rapport aux protocoles de congélation rapide.

TYPE DE CONGELATION	% D'OVOCYTES "NORMAUX"
Tissu ovarien non congelé	96
Congélation lente	56
Congélation intermédiaire	21
Congélation rapide	12

Tableau 7: Comparaison de différents protocoles de congélation du tissu ovarien humain (Gook et al., 1999).

De plus, il retrouve 85 % d'ovocytes normaux après un temps de déshydratation, en une seule étape, de 90 minutes contre seulement 44 % après

un temps de déshydratation de 30 minutes. Dans son étude, il indique donc que le meilleur taux de follicules primordiaux intacts est obtenu grâce à un temps de déshydratation de 90 minutes suivi d'une congélation lente et d'une décongélation rapide (Gook *et al.*, 1999).

Différents protocoles de congélation pouvant être utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

CRYOPROTECTEUR	PROPANEDIOL		DIMETHYLSULFOXIDE	
	1,5 M PRO OH 0,1 M SUCROSE 20 % SERUM	1,5 M PRO OH 0,2 M SUCROSE 30% SERUM	1,5 M DMSO 20% SERUM	1,5 DMSO 0,1 M SUCROSE 20% SERUM
Temps de déshydratation	15 min	30 min à +4 °C	15 min	30 min à +4°C
Température de départ	18°C	0°C	0°C	0°C
Pente de descente en T° t1	- 2°C/min			
T°C de seeding	- 8 °C	- 9 °C	- 7 °C	- 7 °C
Temps d'équilibration	10 minutes			
Pente de descente en T° t2	- 0,3°C/min			
Pente de descente en T° t3	Jusqu'à -30°C: - 50 °C/min	Jusqu'à -40°C: -10°C/min		
Stockage	N2 liquide (quand -150°C)			
Référence	In AMP (Guérif., 2005)			

Tableau 8: Protocoles de congélation : In AMP (Guérif., 2005)

La décongélation des fragments ovariens doit être réalisée rapidement ; les tubes ou les paillettes sont extraits de l'azote liquide et plongés dans un bain marie à 37 °C. Dès le dégel des milieux de congélation, les fragments ovariens sont retirés et lavés dans une succession de trois bains de Leibowitz afin d'éliminer toute trace de cryoprotecteurs dont certains sont cytotoxiques à température ambiante (DMSO) (Aubard *et al.*, 2002).

En effet, la greffe de tissu ovarien chez la souris après une décongélation rapide a permis d'obtenir plus de grossesses qu'après une décongélation lente du tissu ovarien (Kim, 2006).

Les protocoles de « congélation lente » du tissu ovarien ont donc montré leur efficacité. Cependant, la congélation d'un organe tel que l'ovaire paraît plus difficile que la congélation d'une simple cellule. Les principaux dangers sont la formation de cristaux intracellulaires et la déshydratation trop importante des cellules. Afin de diminuer les altérations cellulaires lors de la congélation, il faut trouver un compromis entre des vitesses trop lentes provoquant la contraction des cellules et des vitesses trop rapides responsables de la formation de cristaux intracellulaires.

Actuellement, le meilleur taux de survie des follicules après un protocole de congélation lente suivie d'une décongélation rapide est de 70-80 % (Kim, 2006).

Les altérations du tissu ovarien étant majoritairement secondaires à la formation de cristaux intra et extracellulaires, l'utilisation de vitesses de refroidissement très élevées pourrait présenter de nombreux avantages ; c'est le principe de la vitrification.

c) La vitrification :

La vitrification est une technique de cryopréservation dite « ultra-rapide » jusqu'à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (température de l'azote liquide) qui consiste à fabriquer un verre. C'est un processus par lequel une solution très concentrée, lorsqu'elle est refroidie à très basse température, se transforme en état vitreux sans passer par une phase cristalline. Au cours du refroidissement, les liquides sont piégés en un état solide (ou vitreux) du fait de l'augmentation brutale de la viscosité à la température dite de transition vitreuse, évitant ainsi la formation de cristaux de glace. Ce processus nécessite des vitesses de refroidissement élevées qui sont abaissées grâce à l'utilisation de cryoprotecteurs à haute concentration.

La vitesse de refroidissement optimale est celle qui permet au plus d'eau possible de sortir de la cellule afin d'être vitrifiée à l'extérieur de la cellule. La vitesse critique de refroidissement dépend de la taille de l'échantillon, du type et de la concentration en cryoprotecteurs et du volume du récipient contenant l'échantillon (cryotube, paillette).

Les cryoprotecteurs utilisés à haute concentration (6-9 M) permettent d'augmenter la viscosité des milieux intra et extracellulaires sans modifier la composition du milieu. Ils permettent d'obtenir un état hypervisqueux ou vitreux lors de la plongée dans l'azote liquide. Le point de vitrification des solutions de cryoprotecteurs s'élève au fur et à mesure que leurs concentrations augmentent. Cependant, cet effet dose-dépendant est limité par la toxicité des cryoprotecteurs qui doit rester tolérable pour les cellules. La vitrification nécessite donc de trouver un compromis entre une vitesse maximale de refroidissement et une concentration minimale en cryoprotecteurs.

De plus, afin de réduire le gradient thermique, la taille de l'échantillon à congeler doit être réduite et le support doit favoriser au mieux le contact de l'échantillon avec l'azote liquide.

Enfin, l'étape de réchauffement de l'échantillon vitrifié devra être rapide afin d'éviter la formation de cristaux ainsi que la survenue de fractures du fait de la fragilité du verre formé qui est sensible aux chocs et aux gradients thermiques trop importants (Lornage *et al.*, 2006).

En 2001, Yin a montré que la congélation de tissu ovarien bovin par vitrification, après un temps d'équilibration de 20 minutes à température ambiante dans une solution contenant de l'éthylène glycol à 5.5 M, était aussi efficace qu'un protocole de congélation lente (Kim, 2006).

Quelques études ont également décrit la réussite de protocoles de vitrification d'ovaires entiers, avec des résultats encourageants chez le rat et la souris. En effet, en 2000, Sugimoto congela des ovaires de rat par vitrification dans une solution VS1 contenant 20.5 % de DMSO, 15.5 % d'acétamide, 10 % de propylène glycol et 6 % de polyéthylène glycol. Il les greffa ensuite chez ces mêmes rats, chez qui l'autre ovaire avait été enlevé précédemment. Le temps nécessaire à la restauration d'une fonction ovarienne chez ces rats était identique à celui de rats greffés avec des ovaires frais (groupe témoin). De plus, l'examen histologique des ovaires montrait que, même si le nombre de follicules était plus faible que chez les rats témoins, des follicules antraux et des petits follicules étaient présents dans les ovaires congelés par vitrification (Sugimoto *et al.*, 2000).

Migishima *et al.* ont également montré, chez la souris, le maintien d'une fécondité spontanée après cryopréservation du tissu ovarien par vitrification, avec obtention de naissances même si le taux de grossesse était plus faible que dans le groupe contrôle (Migishima *et al.*, 2003).

Enfin, l'ultrastructure folliculaire et ovocytaire ont été étudiées après vitrification d'ovaires de souris avec une solution de vitrification utilisant de l'éthylène glycol. Il n'a pas été décrit d'importants changements structuraux par rapport au groupe témoin (Salehnia *et al.*, 2002).

En 2006, Lornage *et al.*, ont évalué une technique de vitrification d'ovaires entiers chez la brebis en utilisant deux solutions de vitrification, VS1 et VS4 (contenant 3 cryoprotecteurs : DMSO, formamide et PROH). Leur protocole de vitrification leur a permis de récupérer une fonction ovarienne et des gestations. De plus la solution VS4 apparaissait moins toxique que la solution VS1, protégeant mieux les follicules (Lornage *et al.*, 2006).

Chez l'homme, Isachenko *et al.*, ont montré que la solution de vitrification devait comporter de l'éthylène glycol, un dissaccharide et du jaune d'œuf (Isachenko *et al.*, 2003).

La vitrification offre donc de nombreux avantages théoriques en cryobiologie pour la conservation de tissus complexes par rapport aux méthodes de congélation dites « lentes ». Elle permet d'éviter la formation de cristaux délétères aux systèmes cellulaires hétérogènes. Cependant, des améliorations concernant les protocoles sont encore nécessaires avant d'espérer rendre cette technique applicable en médecine humaine (Lornage *et al.*, 2006).

D. Les modalités d'utilisation du tissu ovarien congelé :

Etant donné que seuls les follicules primordiaux survivent à la congélation-décongélation, une maturation folliculaire et ovocytaire est nécessaire avant la fécondation (Aubard *et al.*, 2002). Cette maturation folliculaire peut être réalisée, en théorie, selon plusieurs modalités : la greffe de tissu ovarien (greffe orthotopique, hétérotopique...) ou la croissance folliculaire *in vitro*.

1. Autogreffe de fragments ovariens :

a) Greffe orthotopique :

L'autogreffe ovarienne orthotopique permet de replacer le tissu ovarien congelé dans sa position pelvienne initiale. Elle est réalisée en vue de la restauration d'une fertilité spontanée.

La première grossesse obtenue avec ce modèle fut celle de Parrott en 1960 après la réalisation d'une greffe orthotopique chez la souris.

Ensuite, en 1997, l'équipe de Dr Aubard a obtenu des grossesses chez le rat avec ce même type de greffe (Aubard *et al.*, 2002).

En 1994, Gosden *et al.* ont obtenu la première grossesse chez un gros animal, la brebis, après une autogreffe de tissu ovarien. Gosden avait amarré les fragments ovariens sur le ligament large à proximité du pavillon tubaire. Il n'a obtenu que 2 grossesses, l'une avec un greffon congelé et l'autre avec un greffon non congelé (Gosden *et al.*, 1994). De plus, afin d'évaluer la durée de vie des greffons, 8 brebis ont à nouveau bénéficié d'une autogreffe bilatérale de tissu ovarien. 22 mois après la greffe, les greffons se sont avérés capables d'ovuler mais ils étaient très pauvres en follicules primordiaux (Kim, 2006).

En 2002, Salle *et al.* ont réussi à reproduire à une plus large échelle ce travail encourageant. Ils ont réalisé la congélation de six ovaires provenant de six brebis différentes. Puis, après avoir enlevé l'ovaire restant chez ces brebis, ils ont réalisé une autogreffe orthotopique de fragments ovariens au niveau du hile de l'ovaire controlatéral. Cette technique leur a permis d'obtenir 4 grossesses et la naissance de six brebis (Salle *et al.*, 2002).

Il est donc clair que cette technique est tout à fait fonctionnelle chez l'animal, essentiellement lorsqu'il existe une bourse ovarienne, comme chez le rat

et la souris. En effet, cette bourse ovarienne rend la greffe orthotopique simple et elle assure une bonne vascularisation aux greffons.

Chez l'Homme, malgré l'absence de bourse ovarienne, l'autogreffe orthotopique de tissu ovarien a permis non seulement la restauration d'une fonction endocrine mais également l'obtention de grossesses.

En 2000, une patiente de 29 ans, présentant des signes cliniques d'insuffisance ovarienne, a bénéficié d'une autogreffe orthotopique de tissu ovarien congelé puis décongelé. Oktay *et al.* ont choisi de transfixer les greffons par un fil et de les positionner en coelioscopie sous le feuillet postérieur du ligament large, renonçant ainsi d'emblée à une fertilité naturelle spontanée. Les résultats en terme de survie des greffons ont été pauvres puisque la patiente, six mois après la greffe, n'avait pas ovulé spontanément ; elle a toutefois répondu à une induction d'ovulation (Oktay & Karlikaya, 2000).

En 2001, Radford et son équipe ont réalisé une greffe orthotopique chez une patiente de 36 ans chez qui l'ovaire droit avait été retiré puis congelé dans le cadre du traitement d'une maladie de Hodgkin. Lors de cette greffe, l'ovaire gauche avait été utilisé comme site receveur des fragments ovariens. Le résultat pour cette patiente, pourtant âgée de 36 ans, a été la sécrétion d'oestrogènes par le greffon en dehors de toute stimulation. En effet, sept mois après la greffe, la patiente n'a plus présenté de bouffées de chaleur et son bilan hormonal a montré une augmentation du taux d'oestradiol avec baisse concomitante des taux de FSH et de LH. Cependant, 9 mois après la greffe, le bilan hormonal est redevenu identique à celui avant la greffe (Radford *et al.*, 2001).

Bilan Hormonal	Avant greffe	7 mois après greffe	7 mois + 1 semaine après greffe
Oestradiol (pmol/L)	< 100	217	352
LH (UI/L)	75	73	52
FSH (UI/L)	104	66	52

Tableau 9 : Restauration d'une fonction ovarienne après greffe orthotopique (Radford et al., 2001).

En 2002, une congélation de tissu ovarien a été réalisée chez une patiente de 32 ans, traitée pour une maladie de Hodgkin par plusieurs cures de chimiothérapie de type CHOP. Cette patiente présentant des signes cliniques et biologiques (FSH=99 UI/L) d'insuffisance ovarienne, a bénéficié, en avril 2003, d'une greffe orthotopique de tissu ovarien précédemment congelé. Huit semaines après la transplantation, 2 follicules de 10 et 15 mm étaient repérés en échographie. Puis, dans les mois suivants, cette patiente a récupéré des cycles menstruels. Après un traitement de stimulation, un follicule s'est développé et a produit un ovocyte en métaphase II. Malheureusement, il n'y a pas eu fécondation de cet ovocyte après ICSI (Tryde Schmidt *et al.*, 2004).

En septembre 2004, l'équipe de Donnez a annoncé la première naissance d'une petite fille après greffe orthotopique de fragments ovariens congelés puis décongelés (Donnez *et al.*, 2004) En effet, sept ans après le traitement d'une maladie de Hodgkin, la patiente bénéficia d'une greffe orthotopique de tissu ovarien et cinq mois après la greffe, on observait la restauration de cycles menstruels.

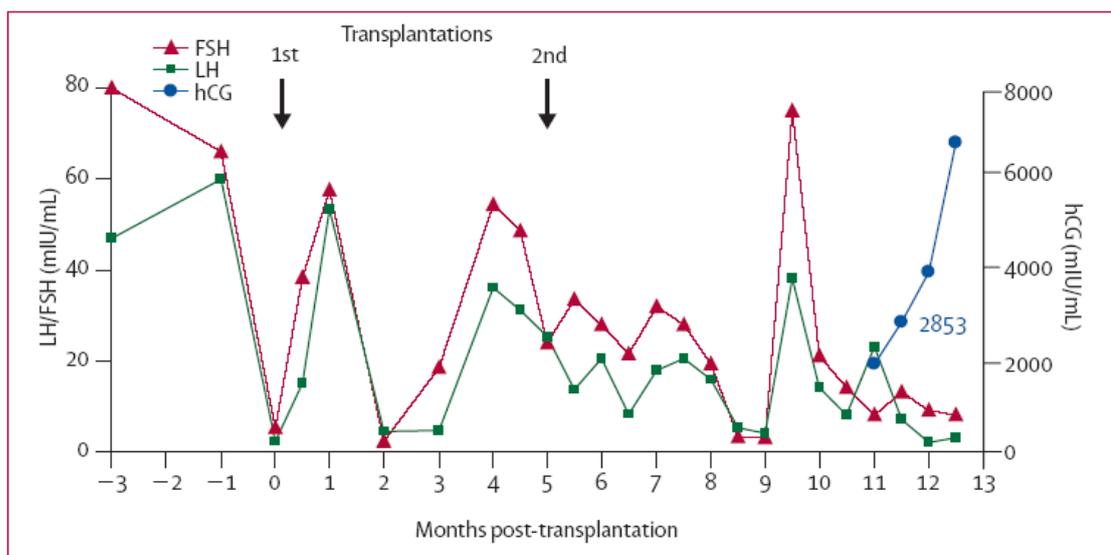


Figure 20: Restauration de cycles menstruels après greffe orthotopique de fragments ovariens (Donnez *et al.*, 2004).

Une deuxième naissance après greffe orthotopique de tissu ovarien a ensuite été rapportée par Meirrow en juillet 2005 (Meirrow *et al.*, 2005).

En janvier 2006, Donnez a de nouveau rapporté la restauration d'une fonction ovarienne chez une patiente ayant subi une cryopréservation d'un ovaire avant greffe de moelle osseuse. Cette patiente avait bénéficié d'une transplantation orthotopique de l'ovaire droit en 2004 ; 4.5 mois après la greffe, elle a présenté un cycle menstruel confirmé par la biologie et l'échographie. On peut remarquer que l'ovaire non prélevé, même atrophique, est un site idéal pour recevoir le tissu ovarien (Donnez *et al.*, 2006).

En avril 2006, une nouvelle grossesse après greffe combinée orthotopique et hétérotopique a été rapportée chez une patiente de 29 ans qui avait bénéficié d'une congélation ovarienne avant greffe de moelle osseuse dans le cadre d'une maladie de Hodgkin. Malheureusement, la patiente a fait une fausse couche après 7 semaines de gestation (Demeestere *et al.*, 2006).

Un an après la greffe de tissu ovarien, la patiente a bénéficié d'une seconde greffe de tissu ovarien. Une grossesse spontanée a ainsi été obtenue cinq mois

après cette deuxième greffe, grossesse actuellement encore en cours (Demeestere, 2007).

Les différents cas de grossesse obtenus grâce à cette technique confirment donc son efficacité pour restaurer une fonction ovarienne chez l'homme. Cependant la durée de « vie » des greffons pouvant être espérée est une notion encore inconnue. Une étude a été réalisée, entre 2003 et 2006 chez 6 patientes ayant bénéficié d'une ou de 2 autogreffes de tissu ovarien. En moins de 20 semaines après chaque autogreffe, les patientes rapportaient la disparition des signes cliniques de ménopause ; de plus des follicules étaient visibles à l'échographie et la moyenne de leur taux de FSH passait de 84 à 19 UI/L. La durée de « vie » des transplants était variable selon les patientes ; elle oscillait entre 7 et plus de 45 mois. Une de ces 6 patientes est, à ce jour, enceinte de plusieurs mois (Andersen, 2007).

b) Greffe hétérotopique :

Une alternative à la greffe orthotopique serait de réimplanter le tissu ovarien dans un autre site que sa situation originelle, réalisant ainsi une greffe hétérotopique.

Des expériences animales ont montré que les greffons ovariens reprenaient parfaitement en de nombreux sites tels que le rein, l'espace sous-cutané, la rate, sous le péritoine..., l'implantation étant possible partout où existe une vascularisation suffisante (Aubard *et al.*, 2002).

Si le but est d'obtenir des grossesses, il serait alors nécessaire après maturation folliculaire de recourir à la FIV.

De plus, la greffe hétérotopique (par exemple, en sous-cutané) pourrait présenter l'avantage d'être moins invasive pour réaliser la ponction des ovocytes.

En 1999, l'équipe du Dr Aubard a réimplanté des greffons ovariens congelés puis décongelés sous la peau du ventre des brebis. Cette expérience

leur a permis d'obtenir des ovulations spontanées chez la majorité des animaux et des maturations ovocytaires complètes après stimulation. Cependant, après FIV, les embryons n'ont pas progressé plus loin que le stade quatre cellules (Aubard *et al.*, 1999).

En 2001, Oktay *et al.* ont rapporté le premier cas de greffe hétérotopique avec du tissu frais dans l'espèce humaine, sous la peau de l'avant bras. Plusieurs semaines après la greffe, une échographie a montré la présence d'un follicule dominant de 12 mm et de quatre autres follicules antraux de 5 à 7 mm. Ils ont donc obtenu une ovulation au sein de ce greffon et ont ponctionné un ovocyte mature (Oktay *et al.*, 2003).

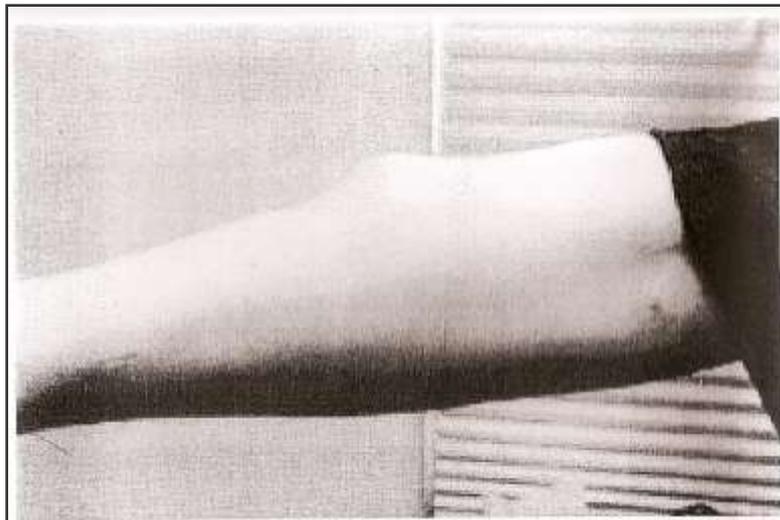


Figure 21: Greffe hétérotopique (Oktay *et al.*, 2003)

La greffe au niveau des avant-bras semble présenter plusieurs avantages . Elle est simple, elle ne nécessite pas d'anesthésie générale et le monitoring du tissu ovarien greffé est facile. De plus, il est aisé dans ce cas de réaliser des procédures séquentielles afin de rajouter des fragments ovariens selon l'évolution des premiers greffés.

Puis en 2004, l'équipe d'Oktay a de nouveau montré la restauration d'une fonction ovarienne chez une patiente de 30 ans, traitée par chimiothérapie et ayant subi une cryopréservation ovarienne, dans le cadre d'un cancer du sein. En effet, six ans après la cryopréservation ovarienne, cette patiente a bénéficié

d'une greffe de tissu ovarien en sous-cutanée au niveau de l'abdomen. Trois mois après la greffe, l'équipe a pu constater le développement d'un follicule et la production d'œstrogènes. 20 ovocytes ont ensuite été ponctionnés après stimulation ovarienne ; 8 FIV ont été réalisées et une a permis le développement d'un embryon à quatre cellules (Oktay *et al.*, 2004).

Kim *et al.* ont ensuite examiné, chez une patiente de 37 ans présentant un cancer du col utérin, deux sites différents de greffe hétérotopique : le sein et l'abdomen (sous l'aponévrose des muscles droits). Grâce à cette étude, ils ont montré que l'abdomen était un meilleur site d'implantation de la greffe que le sein. En effet, 14 semaines après la greffe, l'échographie a révélé la présence d'un follicule au niveau abdominal ; par contre, il n'y avait aucun signe de développement folliculaire au niveau du sein (Kim *et al.*, 2004).

Enfin, en Mai 2006, Rosendahl *et al.* ont annoncé l'obtention d'une grossesse « biochimique » après greffe hétérotopique de tissu ovarien chez une patiente de 28 ans traitée pour une maladie de Hodgkin. Ils ont donc apporté la preuve définitive qu'une grossesse était possible après greffe de tissu ovarien congelé. Malheureusement, cette grossesse n'a pas pu aboutir (Rosendahl *et al.*, 2006) .

A ce jour, aucune naissance n'a été obtenue suite à une greffe hétérotopique.

c) Perspectives :

Les techniques actuelles de greffes hétéro ou orthotopiques sont à l'origine d'une perte folliculaire importante, causée par une ischémie post-greffe du fait de l'attente du développement d'une néovascularisation spontanée (Newton *et al.*, 1996).

Cette perte folliculaire est probablement la cause de la courte durée fonctionnelle des greffons. C'est pourquoi, quelques jours avant la greffe orthotopique, il est recommandé de réaliser une coelioscopie afin de préparer le site à la greffe en stimulant la néovascularisation.

Certaines équipes se tournent donc actuellement vers la cryoconservation d'un ovaire entier avec son pédicule vasculaire. Une telle méthode permettrait de diminuer la durée d'ischémie post-greffe grâce à une transplantation ovarienne par anastomoses vasculaires (Kim, 2006).

La transplantation par micro-anastomoses vasculaires au pédicule épigastrique inférieur a été proposée par l'équipe du Dr Jeremias, chez la brebis, permettant une revascularisation immédiate du transplant après décongélation (Jeremias *et al.*, 2002). Les suites immédiates ont toutefois été marquées par une thrombose de 8 transplants sur 13. L'équipe soulignait que les vaisseaux ovariens de la brebis sont très tortueux et à haut risque de thrombose (Bedaiwy *et al.*, 2006).

En 2003, Yin *et al.* ont étudié la restauration de la fonction ovarienne chez la rat après cryopréservation d'ovaires entiers avec leurs pédicules vasculaires. 57 % des greffons ont survécu plus de 60 jours permettant la restauration d'une fonction ovarienne et l'obtention d'une grossesse (Yin *et al.*, 2003).

En 2004, un essai de congélation lente d'ovaire humain avec son pédicule lombo-ovarien a été réalisé par l'équipe du Dr Martinez (Martinez-Madrid *et al.*, 2004). Trois ovaires ont été prélevés chez des patientes âgées de 29 à 36 ans. Ils ont ensuite été congelés selon un protocole de congélation lente/décongélation rapide. Le pourcentage de follicules intacts était de 99.4% dans le tissu ovarien frais, de 98.1 % après exposition aux agents cryoprotecteurs et de 75.1 % après décongélation. De plus, l'étude histologique du tissu ovarien à ces trois moments ne présentait aucune différence : la présence de follicules et d'ovocytes intacts était décrite, les cellules du stroma ne présentaient pas de signe de nécrose et les vaisseaux étaient intacts.

En 2006, Bedaiwy *et al.*, ont étudié les dommages causés par la congélation sur le tissu ovarien humain. Lors de cette étude, les 2 ovaires de 2 patientes ont été congelés de 2 manières différentes : 1 ovaire était congelé entier avec son pédicule vasculaire et l'autre sous forme de petites lamelles. Sept jours après décongélation, ils ont obtenu un taux de follicules primordiaux intacts

de 75 et 78 % après congélation des ovaires entiers et de 81 et 83 % après congélation des ovaires préparés en petites lamelles. Ils ont observé, par ces 2 techniques, un compte comparable de follicules primordiaux ainsi que l'absence de zones de nécrose (Bedaiwy *et al.*, 2006).

	CONGELATION DU TISSU OVARIEN	
	Après préparation (lamelles)	Ovaire entier avec pédicule vasculaire
Taux de follicules intacts	82%	76,50%
Vascularisation	Persistante	Persistante

Tableau 10: Taux de follicules ovariens intacts après congélation (Bedaiwy *et al.*, 2006).

La cryopréservation d'un ovaire entier avec son pédicule vasculaire paraît être la meilleure technique afin de diminuer la durée d'ischémie post-greffe et d'augmenter la durée de vie des greffons. Cependant, ce type de greffe présente deux inconvénients : tout d'abord, la difficulté technique de la procédure d'anastomose vasculaire en elle-même, mais surtout la difficulté de la congélation d'un organe entier avec son pédicule vasculaire. En effet, la cryopréservation de tissus hétérogènes comme un ovaire entier nécessite une exposition beaucoup plus longue aux agents cryoprotecteurs et nécessite également de trouver un protocole de congélation adapté à la fois aux cellules, aux follicules, aux vaisseaux...(Martinez-Madrid *et al.*, 2004).

d) Risques de la greffe :

Un des risques majeurs de la greffe est de réinduire la maladie initiale notamment s'il s'agit d'une leucémie ou d'une maladie avec un risque de métastase ovarienne.

Ce risque a été démontré par Shaw chez la souris en 1996. En effet, il a mis en évidence la transmission d'un lymphome à des souris receveuses par le biais de fragments de tissu ovarien (Shaw *et al.*, 1996).

Le risque de transmission de cellules cancéreuses dépend du type de maladie, de son stade et également de l'importance des cellules malignes

présentes dans le greffon. Oktay *et al.* ont établi le risque de localisation ovarienne en fonction des différents types de maladie. Ce risque est essentiellement élevé dans les leucémies aiguës et les neuroblastomes (>11 %), modéré dans les cancers de l'utérus et cancers du sein (0.2 à 11 %) et faible dans les lymphomes hodgkiniens ou non (Oktay, 2001).

L'analyse microscopique du tissu ovarien ne semble pas suffisante pour assurer l'absence de risque de transmission du cancer ; il paraît donc nécessaire de développer des méthodes fiables d'évaluation de la maladie résiduelle telles que la cytométrie de flux ou la biologie moléculaire (Kim *et al.*, 2001).

En 2007, l'équipe du Dr Sanchez a étudié l'incidence des métastases ovariennes présentes chez des patientes atteintes de cancer du sein et ayant bénéficié d'un prélèvement d'ovaire avant le début de la chimiothérapie pour cryopréservation. Une étude à la fois morphologique et immunohistochimique était alors réalisée sur 58 biopsies de tissu ovarien et des cellules néoplasiques ont été retrouvées sur 2 biopsies (3.4 %).

Cette étude confirme donc la possibilité de découvrir des métastases ovariennes chez des patientes atteintes de cancer du sein ; ainsi une analyse minutieuse du tissu ovarien avant cryopréservation est capitale afin de limiter au maximum le risque de réintroduire la maladie lors d'une éventuelle autogreffe de ce tissu (Sanchez, 2007).

2. La xenogreffe :

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

En 1996, Newton *et al.* ont greffé des fragments de tissu ovarien humain chez des souris SCID après les avoir congelés. Ils ont démontré que les greffons reprenaient parfaitement dans les reins des souris. En effet, trois semaines après la greffe, ils ont retrouvé beaucoup de follicules primordiaux mais également des

follicules primaires jusqu'à deux couches de cellules de la granulosa, témoignant d'un début de maturation des follicules humains dans le rein des souris SCID (Newton *et al.*, 1996).

Les différents travaux réalisés retrouvent tous une survie folliculaire qui semble être la meilleure dans les greffons réalisés sous la capsule rénale. Ce dernier site semble meilleur que la greffe sur le péritoine qui est, elle-même, meilleure que la greffe dans l'espace sous-cutané. De plus, la comparaison entre les greffons de tissu congelé et de tissu frais montre peu de différences en terme de survie folliculaire, ce qui laisse penser que la déperdition en follicules est plus le résultat de la greffe elle-même que de la cryopréservation (Aubard *et al.*, 2002).

La maturation folliculaire est en général bloquée au stade deux couches de cellules de la granulosa en l'absence de stimulation (Aubard *et al.*, 2002).

En 1998 l'équipe d' Oktay a montré que l'adjonction de FSH ou d'hCG permettait d'améliorer la maturation folliculaire jusqu'au stade antral (follicules antraux de 5 mm de diamètre au maximum) (Oktay *et al.*, 1998). En effet, en l'absence de stimulation, certains auteurs n'obtiennent pas de follicules antraux (Oktay *et al.*, 1998) ou très peu (Gook *et al.*, 2001).

Puis, en 2002, Kim *et al.* ont mis en évidence que des fragments ovariens humains congelés pouvaient être maturés jusqu'à la formation d'un corps jaune fonctionnel chez des souris SCID castrées et stimulées (Kim *et al.*, 2002).

Malgré les progrès de la xénomaturation, envisager des applications cliniques à la xénogreffe pose un problème éthique majeur (Aubard, 2003). Faire maturer un gamète humain dans un animal doit en effet être envisagé avec circonspection. Il est primordial de répondre à certaines questions :

- Quels sont les risques de transmission de pathogènes animaux au tissu humain greffé ?
- Existe-t'il des risques d'altération du patrimoine génétique ? La réponse paraît clairement négative en xénogreffe d'organe ou de tissu banal, cependant les gamètes ne constituent pas un tissu banal.

Nous sommes donc encore bien loin d'appréhender tous les problèmes que risquent de nous poser la mise au point de la xénogreffe de tissu ovarien.

3. La maturation folliculaire *in vitro* :

Etant donné que seuls les follicules primordiaux survivent aux techniques de congélation décongélation, le système de culture idéal serait celui permettant le développement des follicules du stade primordial jusqu'au stade pré-ovulatoire.

Actuellement, le développement folliculaire complet *in vitro* n'a pu être obtenu que chez la souris et avec un rendement très faible, puisque seulement deux souriceaux ont été obtenus, dont un seul vivant, après transfert de 190 embryons à 2 cellules dans les trompes de souris (Eppig & O'Brien, 1996).

En ce qui concerne la culture folliculaire dans l'espèce humaine, les difficultés sont liées à la longueur de la folliculogénèse chez la femme (six mois) (Gougeon, 1986) et à la taille du follicule préovulatoire (20 mm) qui pose d'énormes problèmes techniques.

En 1997, Abir *et al.* ont démontré que la présence de gonadotrophines (FSH et LH) dans les milieux de culture améliorait le développement folliculaire (Abir *et al.*, 1997); ainsi, l'obtention de l'antrum *in vitro* en présence de FSH est possible.

Cependant, le peu de connaissances des éléments indispensables à une bonne croissance folliculaire, pose des problèmes au niveau de l'élaboration de milieux de culture adaptés à la culture folliculaire *in vitro* (Erickson & Danforth, 1995).

Une étape difficile dans le développement folliculaire est le passage du follicule primordial au follicule primaire. Or, la culture sur membrane de fragments ovariens permet d'assurer cette transition *in vitro* (Hovatta *et al.*, 1997),

l'intégralité folliculaire étant mieux préservée en cultivant des fragments de cortex que des follicules isolés (Depalo *et al.*, 2002). La culture de follicules primordiaux permet donc d'obtenir de nombreux follicules secondaires mais très peu de follicules préantraux (Hovatta, 2000).

Pour la culture des follicules préantraux, celle-ci est possible avec des follicules préantraux isolés (Abir *et al.*, 1997) ou au sein de fines tranches d'ovaires (Hovatta *et al.*, 1997). Après la formation de l'antrum, le follicule dans son entier n'est plus nécessaire pour assurer le développement et la maturation ovocytaire. Il a été montré que la culture de complexes cumulo-ovocytaires provenant de petits follicules à antrum pouvait amener les ovocytes à maturation (Aubard *et al.*, 2002).

Dans l'espèce humaine, la première maturation ovocytaire *in vitro* a été faite par Edwards en 1965. C'est seulement en 1991 que Cha *et al.* ont décrit la première naissance obtenue après maturation ovocytaire *in vitro* d'ovocytes immatures entourés du complexe cumulo-ovocytaire provenant d'ovaires non stimulés (Cha *et al.*, 1991). Depuis d'autres grossesses et naissances ont été rapportées (Cha *et al.*, 2000).

En conclusion, la presque totalité des étapes de la folliculogénèse est à priori possible *in vitro* ainsi que la maturation ovocytaire. L'association de ces techniques et leurs améliorations à venir pourront permettre de s'affranchir des problèmes de greffe de tissu ovarien cryoprésumé.

E. Les indications de la cryopréservation du tissu ovarien :

Etant données les incertitudes encore actuelles sur l'utilisation du tissu ovarien cryoconservé, il paraît légitime de proposer une congélation de cortex ovarien lorsque le risque de stérilité après traitement est quasiment certain, c'est à dire en cas de chimiothérapie à base d'agents alkylants à fortes doses, d'irradiation corporelle totale ou pelvienne, d'ovariectomies bilatérales ou

unilatérales sur ovaire restant (Poirot *et al.*, 2002). Ces indications sont donc liées au type de thérapeutiques utilisées.

Une cryoconservation ovarienne peut donc se faire dans des pathologies variées telles que : (Oktay, 2001)

- les affections malignes de l'enfant : leucémies, maladie de Hodgkin, lymphome non Hodgkinien, neuroblastome, nephroblastome, ostéosarcome, rhabdomyosarcome, sarcome d'Ewing, tumeur de Wilms ;
- les affections malignes de l'adulte : cancer du sein, cancer du col de l'utérus, leucémies, autres pathologies hématologiques ;
- les indications d'ovariectomie
- les indications de transplantation médullaire en dehors des pathologies malignes : anémie aplasique, maladie auto-immunes, thalassémies.

Certains auteurs proposent également d'étendre les indications aux femmes ayant un risque de ménopause précoce familiale ou dans certains syndromes de Turner (Hovatta, 2003).

L'indication est posée de façon pluridisciplinaire entre le cancérologue et/ou le chimiothérapeute et/ou le radiothérapeute, le chirurgien qui assure le prélèvement et le biologiste de la reproduction qui prend en charge la congélation.

F. Les prérequis à la congélation du tissu ovarien :

1. Information et consentement de la patiente :

Jusqu'en 2004, les cryopréservations ovariennes avaient lieu dans le cadre de protocoles de recherche et faisaient l'objet d'une demande au CCPPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche

Biomédicale) selon l'arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux bonnes pratiques en assistance médicale à la procréation.

La loi de Bioéthique d'août 2004 autorise aujourd'hui le prélèvement de tissu germinal dans le cadre de la préservation de la fertilité. La patiente ou son représentant légal, s'il s'agit d'une mineure, doit recevoir une information claire sur la technique par l'équipe multidisciplinaire qui a posé l'indication de la congélation. Il est également clairement expliqué à la patiente ou à son représentant légal que la cryopréservation n'est encore qu'une procédure de recherche clinique et qu'à l'heure actuelle seule deux naissances ont été obtenues dans l'espèce humaine. De plus l'équipe multidisciplinaire doit obtenir le consentement éclairé de la patiente (ou de son représentant légal) et la signature de ce consentement en trois exemplaires.

La cryopréservation de tissu ovarien reste donc actuellement une méthode de recherche. Les solutions palliatives, telles que le don d'ovocytes ou l'adoption, peuvent être envisagées ultérieurement.

2. Approches psychologiques :

Lors des consultations proposés par le médecin biologiste de la reproduction aux familles et aux jeunes filles en situation de préservation de cortex ovarien avant un traitement chimiothérapeutique castrateur, la présence d'un psychologue ou d'un psychiatre spécialisé dans l'abord de la psychopathologie de l'enfant et de la famille est souhaitable (Rosenblum & Rampenaux, 2005).

Au cours de ces consultations, les fonctions du psychologue ou du psychiatre présent seront multiples : écouter afin de permettre l'émergence des angoisses de mort en réponse à la fois au risque vital et à une stérilité annoncée, évaluer le niveau de développement psychoaffectif de la petite fille afin d'adopter le discours informatif le plus approprié, observer la qualité des interactions comportementales et affectives entre un nourrisson et ses parents...

Cette consultation peut être vécue comme pesante par les patientes qui se trouvent à cet instant face à une double finitude. En effet, elles risquent leur mort en tant que sujet mais également la mort de leur filiation. Le biologiste de la reproduction est ici dans la position de proposer une solution pour pallier l'une de ces deux perspectives. L'exposé des techniques de préservation du cortex ovarien permet en effet aux patientes de garder une possibilité d'avoir un enfant. Tout au long de la consultation, une parenthèse se met en place, on ne parle plus de la maladie mais des projets de vie avec la capacité à enfanter. Il y a, à ce moment, un temps de projection dans l'avenir et la maladie est alors passée sous silence pendant quelques minutes. Ce temps va pourtant s'arrêter brutalement au moment de la lecture et de la signature du consentement ; en effet, le point sur le devenir du cortex ovarien en cas de décès renvoie immédiatement à cette éventuelle finalité.

De plus, comme toute technique médicale expérimentale, la cryopréservation de tissu ovarien peut susciter l'émergence de fantasmes chez la femme mais également dans le couple. En effet, certaines patientes pourront s'interroger sur les éventuelles anomalies de leurs futurs enfants, ou sur les utilisations illégales éventuelles que pourrait subir leur cortex ovarien....

Pour toutes ces raisons, une approche multidisciplinaire avec notamment un psychologue ou un psychiatre paraît nécessaire.

Partie II

**Pratique de la cryoconservation
ovarienne au sein du service de
médecine et de biologie de la
reproduction du CHU de Nantes**

I. Objectifs :

Notre étude a été rétrospective s'intéressant aux cas d'autoconservation de tissu ovarien réalisés au laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Nantes entre Juillet 1995 et Mai 2007. Le but principal de cette étude était la cryoconservation de tissu ovarien chez des patientes menacées de perdre leur fertilité. Le but secondaire est la réutilisation de ce tissu afin d'obtenir une (ou des) grossesse(s).

Le protocole de cette étude peut être schématisé de la manière suivante :

- Prélever tout ou une partie du tissu ovarien si possible avant la mise en œuvre des traitements anticancéreux ;
- Conserver ce tissu par congélation pendant toute la durée des traitements et jusqu'à rémission de la maladie ;
- Utiliser ce tissu pour obtenir des ovocytes matures soit en le restituant sous forme de greffe à la patiente quand elle désirera un enfant, soit par maturation folliculaire *in vitro*.

II. Matériels et méthodes :

A. Sélection des patientes :

Les critères de sélection, la prise en charge des patientes et les protocoles de prélèvement et de conservation du tissu ovarien ont été préalablement établis et soumis au Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) du Limousin, le 21 septembre 2000 selon la loi n° 88-1138 (Huriet-Sérusclat). Ce protocole d'étude clinico-biologique multicentrique avec bénéfice direct pour la patiente est coordonné par Y.Aubard (CHU de Limoges).

Le bien fondé de l'indication de chaque prélèvement était analysé de manière pluridisciplinaire par les médecins oncologues prenant en charge la patiente, les chirurgiens et les biologistes de la reproduction. Les jeunes femmes ou jeunes filles pouvant prétendre bénéficier d'une congélation de tissu ovarien étaient reçues en consultation par le chirurgien responsable du prélèvement et par le biologiste responsable de la cryoconservation, après information et proposition de la conservation par l'oncologue. Une information éclairée était donnée oralement et par écrit à la jeune femme et/ou à ces parents.

Le protocole soumis au CCPRB a pris en compte que toutes les patientes soumises à un traitement anticancéreux ne seront pas nécessairement castrées. Pour chaque cas, les conséquences du traitement anticancéreux sur les gonades ont été évaluées :

- Lorsque le traitement envisagé était castrateur de façon certaine (ex : irradiation corporelle totale, association radiothérapie pelvienne-chimiothérapie par agents alkylants, ovariectomie bilatérale), il était alors licite de prélever le plus de tissu ovarien possible puisque celui-ci serait de toute façon perdu.
- Lorsque que, malgré un traitement gonadotoxique important, il était raisonnable de penser qu'une fonction ovarienne restait possible après traitement (ex : radiothérapie pelvienne, agents alkylants), le protocole proposait de n'enlever qu'un ovaire.
- Lorsque le risque gonadotoxique était modéré (ex : agents alkylants ou irradiation pelvienne à faible dose), le prélèvement d'une partie d'un ovaire était proposé.

A Nantes, notre équipe a choisi, dans l'état actuel des connaissances, de ne prélever qu'un seul ovaire.

B. Critères d'inclusion :

Les patientes incluses dans l'étude devaient répondre à plusieurs critères :

- L'indication de prélèvement devait être acceptée à l'unanimité par les médecins oncologues, les biologistes et les gynécologues ;
- La patiente devait avoir le désir de préserver sa fertilité ;
- La patiente devait comprendre la procédure et avoir accepté et signé la feuille de consentement ;
- Pour les mineures, l'accord des deux parents ou du tuteur légal, titulaire d l'autorité parentale était indispensable ;
- Un bilan infectieux devait avoir été réalisé, comprenant des sérologies hépatite B, hépatite C, HIV, syphilis.

De plus, depuis le décret de décembre 2006, la congélation de tissus germinaux n'oblige plus théoriquement le recours à un protocole de recherche.

C. Critères d'exclusion :

Les patientes étaient exclues du protocole d'étude dans les cas suivants :

- Patiente non en état de comprendre l'étude et sa finalité ;
- Patiente de plus de 35 ans ;
- Patiente présentant une contre-indication à l'anesthésie générale, ou une contre-indication opératoire (ex : grande insuffisance respiratoire et/ou cardiaque)

D. Prélèvement du tissu ovarien :

Le tissu ovarien a été prélevé sous anesthésie générale par coelioscopie ou laparotomie. Dans tous les cas un ovaire entier a été prélevé. Pour certaines patientes, le prélèvement de l'ovaire s'est fait à l'occasion d'une intervention chirurgicale abdomino-pelvienne, comme par exemple à l'occasion de la résection tumorale dans le cadre d'un sarcome d'Ewing ou dans le cadre d'un neuroblastome.

Pour les autres patientes, où aucune intervention chirurgicale n'était nécessaire dans le cadre du traitement de la pathologie, le prélèvement a été réalisé le plus souvent par coelioscopie.

Une fois l'ovaire libéré et extrait, il était immédiatement mis dans un flacon stérile contenant un milieu de transport (milieu de Leibovitz) et confié à l'équipe chargée de sa préparation pour la congélation.

E. Préparation du tissu ovarien :

L'ovaire, transporté dans les plus brefs délais au laboratoire de biologie de la reproduction du CHU de Nantes, était ensuite préparé sous hotte dans des conditions d'asepsie chirurgicale. Il était disséqué de manière à séparer le cortex de la médullaire ; le cortex était ainsi affiné sur une épaisseur d'environ un millimètre puis il était sectionné en fragments d'environ 1 mm² en vue d'une réutilisation par maturation in vitro ou en plaques d'environ 1 cm² en vue d'une réutilisation par autogreffe.

Deux fragments de cortex et de médullaire ont été systématiquement placés dans des flacons de formol à 10 % et ensuite confiés à l'anatomopathologiste pour dénombrer les follicules et connaître ainsi la richesse en gamètes du tissu prélevé et rechercher d'éventuelles localisations ovariennes de la maladie.

F. Protocole de congélation du cortex ovarien :

Les fragments de cortex ovarien ont ensuite été placés dans 1 mL de solution de congélation dans des cryotubes de 1,5 mL préalablement placés dans de la glace pilée à 4° C. Les cryotubes étaient ensuite agités pendant 20 minutes à 4 °C pour faciliter la pénétration des cryoprotecteurs.

La solution de congélation était préparée le matin de l'intervention et conservée à 4 ° C. Les cryoprotecteurs utilisés étaient le DMSO et le sucre (1 M). Vingt à trente mL de solution de congélation étaient préparés avec :

- pour les enfants : 14 mL de milieu de Leibovitz filtré
2 mL de la solution de sucre
2 mL de sérum décomplémenté de la patiente
2 mL de DMSO

- pour les adolescentes et adultes : 21 mL de milieu de Leibovitz filtré
3 mL de la solution de sucre
3 mL de sérum décomplémenté
3 mL de DMSO

Le protocole de congélation lente a été effectué à l'aide d'un congélateur programmable. Les cryotubes étaient placés dans ce congélateur dont la température de départ était de 4 ° C. La descente en congélation commençait à la vitesse de 2°C/min jusqu'à - 9° C. A cette température, un seeding manuel était réalisé : le fond des cryotubes était placé pendant environ 2 secondes dans l'azote. Une stabilisation de 5 minutes avait lieu à ce moment puis la descente en température reprenait à la vitesse de 0,3 ° C/min jusqu'à - 40 ° C. Enfin, une troisième descente en température de - 40 ° C à - 140 ° C était réalisée à la vitesse de 10 ° C/min. Les tubes étaient ensuite stockés dans un container d'azote liquide à - 196 ° C.

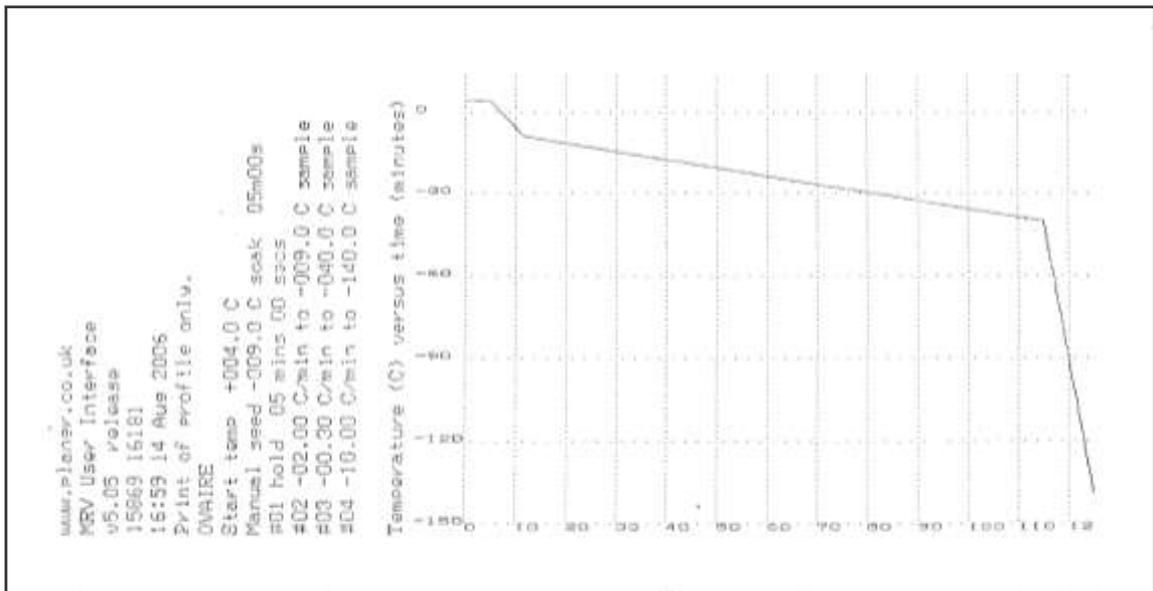


Figure 22: Courbe de descente en température réalisée grâce à un congélateur programmable.

G. Analyse histologique du cortex ovarien :

Pour chaque patiente, un fragment de cortex ovarien ainsi qu'un fragment de médullaire étaient fixés dans 10 % de formol pendant 24 heures. Les fragments étaient ensuite inclus dans de la paraffine puis plusieurs coupes de 4 à 5 μm d'épaisseur étaient faites à l'aide d'un microtome. Les coupes étaient ensuite colorées à l'hématoxyline phloxine safran (HPS) puis observées au microscope.

L'observation de ces coupes avait deux buts : tout d'abord, évaluer d'une manière qualitative puis quantitative la richesse en follicules primordiaux et primaires du cortex ovarien puis, en cas de pathologie tumorale, rechercher la présence de cellules néoplasiques dans le cortex ovarien ainsi que dans la médullaire.

Les follicules ont été comptés suivant la classification suivante :

- Follicule primordial : ovocyte entouré d'une seule couche de cellules folliculaires aplaties ;
- Follicule primaire : ovocyte entouré d'une seule couche de cellules folliculaires cubiques ;
- Follicule secondaire : ovocyte entouré de plusieurs couches de cellules folliculaires ;
- Follicule tertiaire : ovocyte entouré de plusieurs couches de cellules folliculaires au sein desquelles se trouve une cavité antrale.

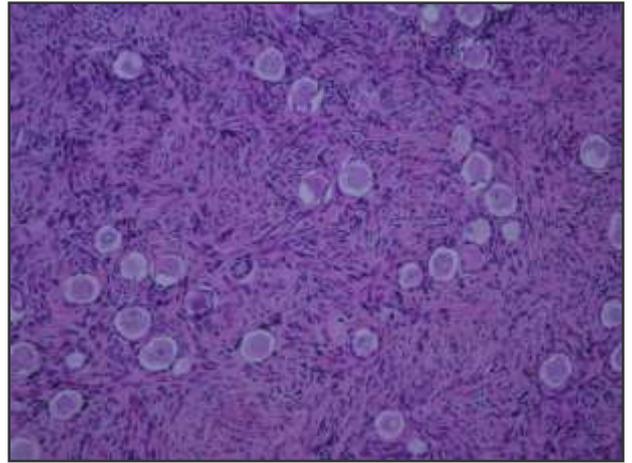
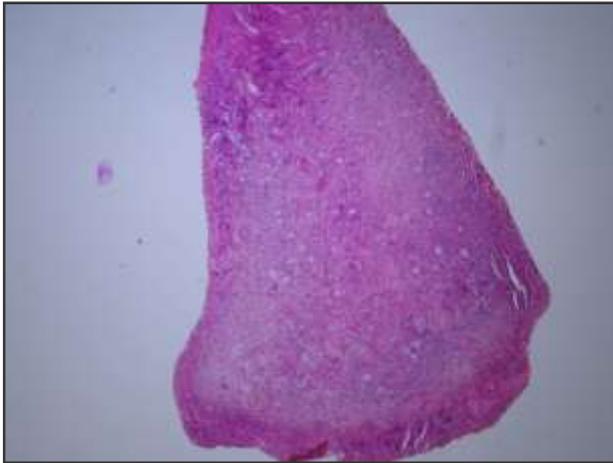


Figure 23 : Coupes de cortex ovarien.

Le calcul du nombre de follicules par mm² était effectué par examen microscopique associé au calcul de l'aire par le logiciel Olympus DP Soft.

H. Evaluation de la réserve ovarienne des patientes au moment de la congélation :

Afin d'évaluer la réserve ovarienne des patientes au moment de la congélation du tissu ovarien, nous avons obtenu les sérums de 20 d'entre elles (sérums qui avaient été congelés quelques jours avant la cryopréservation ovarienne).

Un dosage de l'hormone anti-mullerienne (AMH) a ensuite été réalisé sur ces 20 sérums au sein du service de biochimie du CHU de Nantes.

Le dosage d'AMH était réalisé par une technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assy) de type sandwich à deux étapes immunologiques (trousse Beckman Coulter Immunotech).

Chez les femmes présentant un statut folliculaire normal, les résultats d'AMH sérique obtenus à J3 du cycle menstruel lors de la validation de cette nouvelle trousse donnaient une moyenne égale à 4.2 ng/mL (SD= 1.75) et une médiane à 4 ng/ml (2.0-6.8).

	Femmes présentant un statut folliculaire normal	
	Médiane (10°-90° percentiles)	Moyenne (SD)
AMH (ng/mL)	4,0 (2,0-6,8)	4,2 (1,75)
AMH (pmol/L)	28,6 (14,3-48,5)	30,0 (12,5)

Tableau 11 : Valeurs d'AMH (médiane et moyenne) retrouvées chez des femmes présentant un statut folliculaire normal (kit Beckman Coulter Immunotech).

I. Analyse statistique :

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Medcalc.

Le test de Student a été utilisé afin de comparer les moyennes d'hormone anti-mullerienne retrouvées chez nos patientes à celles retrouvées dans la littérature.

Le test de Spearman a été utilisé pour étudier la corrélation entre l'âge des patientes et le compte folliculaire.

Pour toutes les analyses, une valeur de p inférieure à 0.05 a été considérée comme significative.

III. Résultats :

A. Evolution du nombre d'autoconservations ovariennes :

Cinquante autoconservations ovariennes ont été réalisées dans le service de biologie de la reproduction du CHU de Nantes entre juillet 1995 et mai 2007 dont 8 entre 1995 et 2001 et 42 entre 2002 et mai 2007.

On note une nette augmentation du nombre de cryoconservations ovariennes à partir de l'année 2002.

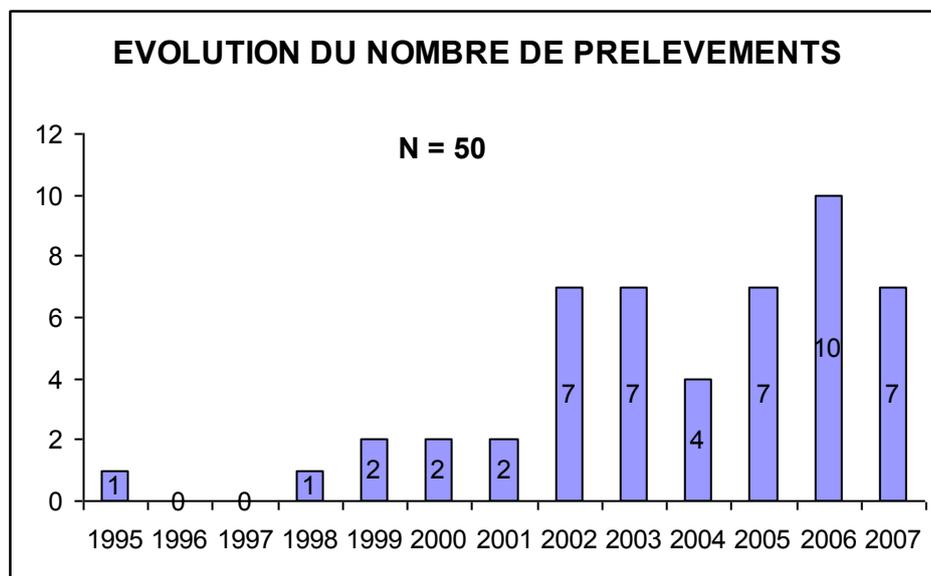


Figure 24 : Evolution du nombre de prélèvements ovariens réalisés au CHU de Nantes entre 1995 et Mai 2007.

B. Répartition par groupe d'âge :

L'âge moyen le jour de l'autoconservation était de 14.12 ans +/- 8 ans.

La patiente la plus jeune avait 8 mois au moment du prélèvement et la plus âgée 32 ans.

Trente trois patientes (66 %) étaient mineures le jour du prélèvement.

17 patientes avaient 18 ans ou plus, 17 patientes avaient entre 12 et 18 ans et 16 patientes avaient moins de 12 ans.

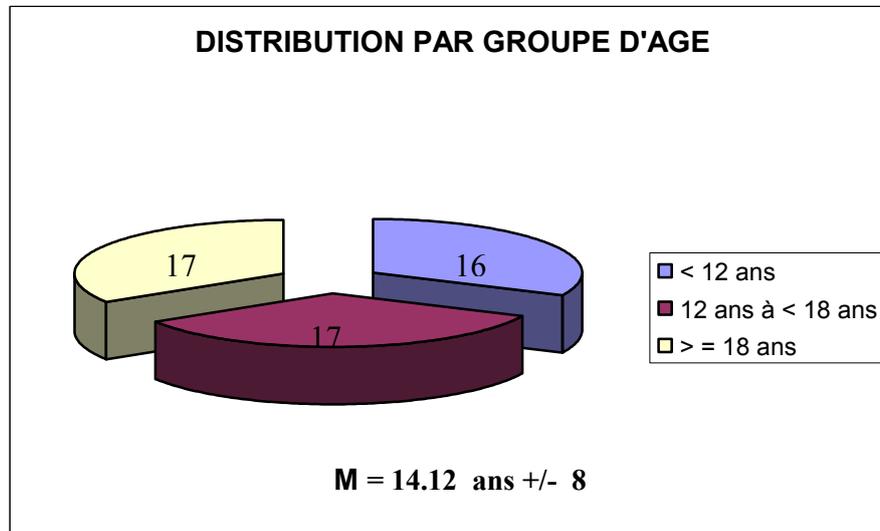


Figure 25: Age des patientes au moment de la congélation ovarienne.

C. Répartition selon le type de pathologie :

Les pathologies hématologiques malignes représentaient 36 indications de prélèvement soit 72 % : 15 cas pour lymphome, 11 cas pour leucémie aiguë lymphoïde, 8 cas pour leucémie aiguë myéloïde, 1 cas pour leucémie myéloïde chronique, 1 cas pour myélome.

Douze cas d'autoconservation ovarienne, soit 24 %, ont été réalisés pour des tumeurs solides : 5 cas pour sarcome, 4 cas pour neuroblastome, 1 cas pour néphroblastome, 1 cas pour rhabdomyosarcome, 1 cas pour gliome cérébral.

Deux indications de cryoconservation pour pathologies non malignes, soit 4 %, ont été retenues : une indication pour kystes ovariens récidivants et une indication pour maladie de Chediak-Higashi.

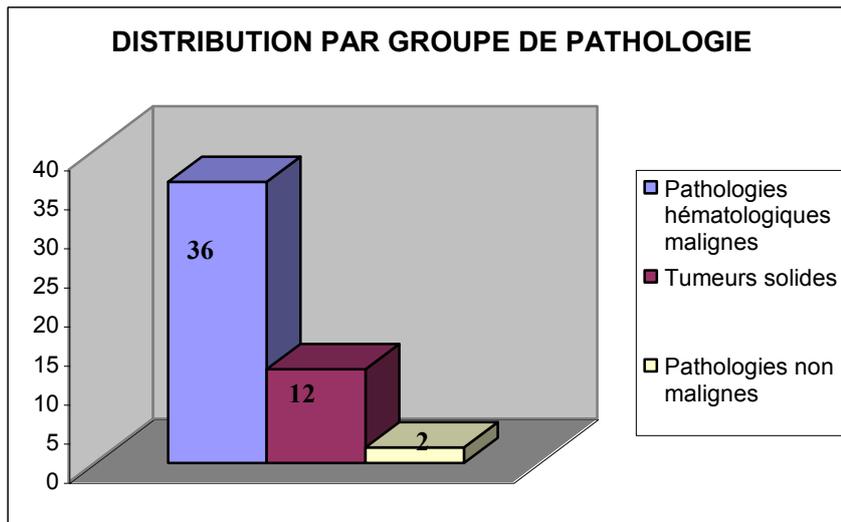


Figure 26: Répartition selon le type de pathologie.

D. Type de traitement gonadotoxique délivré avant cryoconservation :

Un traitement gonadotoxique a été débuté dans 90 % des cas avant le prélèvement ovarien (n = 45) : chimiothérapie (n = 36), chimio-radiothérapie (n = 9).

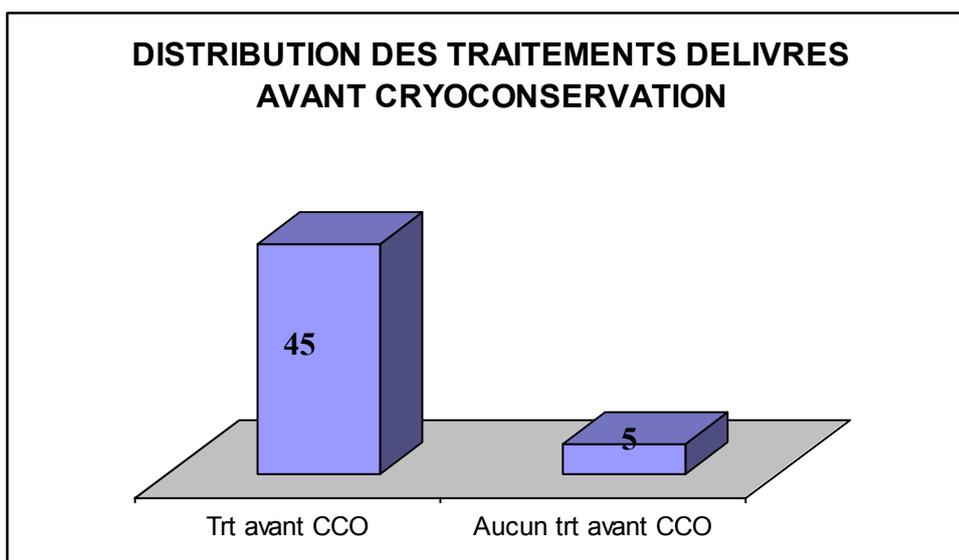


Figure 27: Patientes ayant eu un traitement gonadotoxique avant la cryoconservation ovarienne.

Parmi les 45 patientes ayant reçu de la chimiothérapie ou de la chimio-radiothérapie avant le prélèvement ovarien, 33 (c'est à dire environ 73 %) ont reçu une voire plusieurs cures contenant des alkylants.

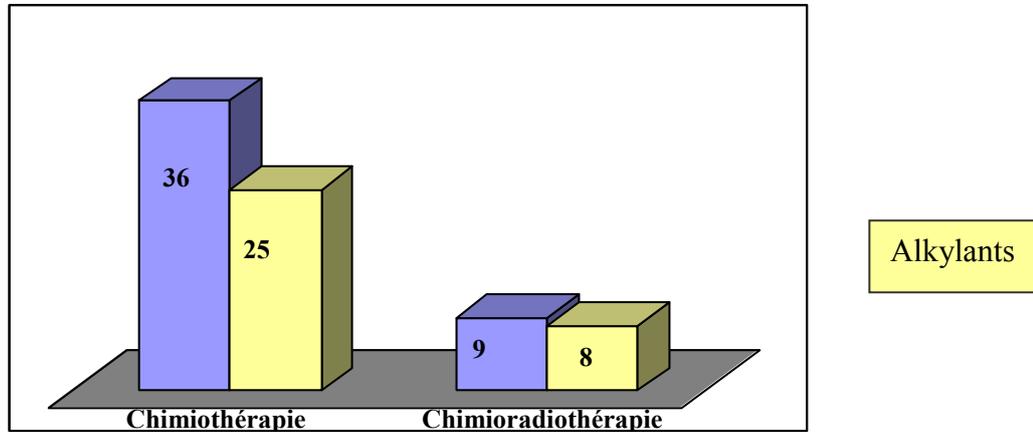


Figure 28: Nombre de patientes ayant reçu une chimiothérapie par alkylants avant la cryopréservation ovarienne.

Les indications du prélèvement d'ovaire ont été :

- un traitement pré greffe dans 72 % des cas (n = 36)
- une chimiothérapie dans 16 % des cas (n = 8)
- une chimio-radiothérapie dans 8 % des cas (n = 4)
- une radiothérapie seule dans 2 % des cas (n = 1)
- une ovariectomie bilatérale dans 2 % des cas (n = 1)

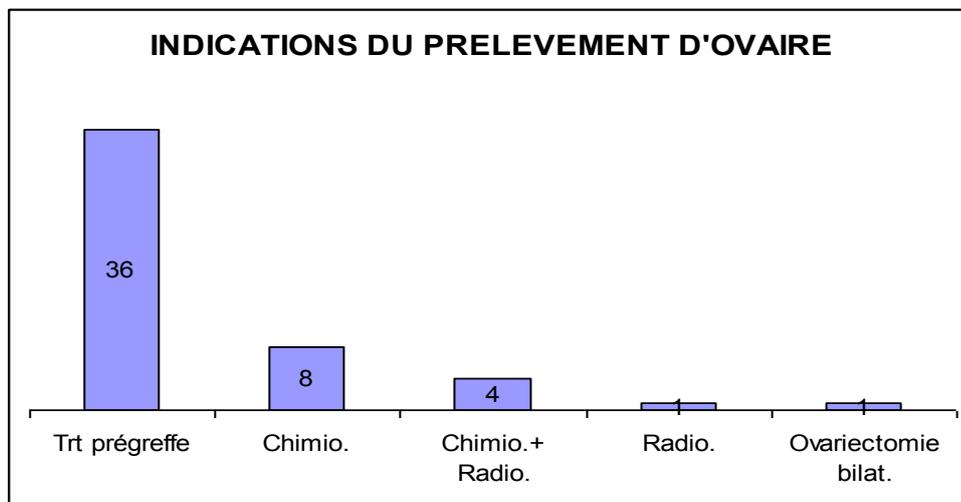


Figure 29 : Indications du prélèvement d'ovaire.

E. Etude anatomopathologique :

L'analyse du cortex ovarien a été qualitative et quantitative pour nos 50 patientes.

Dans un premier temps, l'analyse qualitative a permis de retrouver, chez deux patientes, une infiltration par des cellules tumorales au niveau ovarien ; à noter que ces deux patientes étaient atteintes de LAM.

Dans un second temps, nous avons calculé, sur plusieurs coupes de cortex ovarien, le nombre de follicules primordiaux et primaires retrouvés par mm².

Pour 13 patientes, le compte folliculaire par mm² s'est avéré inexploitable du fait d'importants artefacts de dessiccation.

Pour les patientes âgées de moins de 10 ans, le nombre moyen de follicules primordiaux et primaires était de 49.70/mm² (+/- 45.29) (n=12, avec une moyenne d'âge de 4.43 +/- 2.61). Il était de 9.46/mm² (+/- 10.02) entre 10 et 15 ans (n=10, avec une moyenne d'âge de 13.53 +/- 1.46) et de 8.64/mm² (+/- 9.04) pour les patientes de plus de 15 ans (n=15, avec une moyenne d'âge de 21.42 +/- 5.06).

L'analyse statistique par le test de Spearman a permis de confirmer l'existence d'une corrélation inverse entre l'âge des patientes et le compte folliculaire (p = 0.0017).

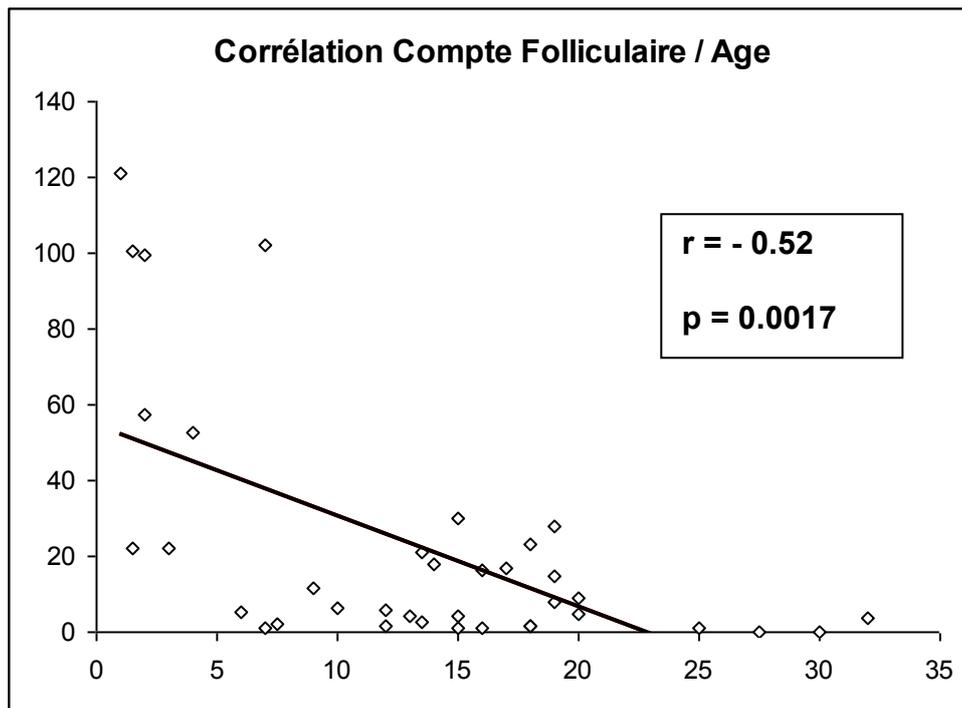


Figure 30: Corrélation entre le compte folliculaire par mm² et l'âge des patientes.

F. Bilan hormonal :

Lors de notre étude, nous avons retrouvé des valeurs d'AMH inférieures au seuil de détection fonctionnelle, c'est à dire inférieures à 0.35 ng/mL, pour 15 patientes sur 20 soit 75 %. Deux patientes avaient un taux inférieur à 1 ng/mL. Seules trois patientes avaient un taux d'AMH au moment de la congélation ovarienne supérieur à 2 ng/mL (valeur correspondant à la normale basse retrouvée chez des patientes « normales » lors de l'évaluation de notre trousse). Parmi ces trois patientes, une n'avait pas reçu de chimiothérapie avant la cryopréservation de tissu ovarien et les deux autres avaient reçu plusieurs cures de chimiothérapie mais sans agents alkylants.

De plus, chez une patiente, un dosage d'AMH a été réalisé avant la 1^{ère} cure de chimiothérapie et un deuxième dosage a ensuite été effectué au moment de la congélation ovarienne c'est à dire après une cure de chimiothérapie. L'AMH de cette patiente était de 2.42 ng/mL avant chimiothérapie ; elle était < 0.35 ng/mL après une cure de chimiothérapie.

Afin d'interpréter au mieux les résultats d'hormone anti-müllérienne de nos patientes, nous les avons comparé avec des valeurs d'AMH retrouvées chez des patientes « saines » du même âge en utilisant un test statistique de Student. Chez les patientes de moins de 10 ans, nous observons une différence significative ($p = 0.001$) entre la moyenne d'AMH retrouvée pour nos patientes et celle retrouvée lors de l'étude de Lee (Lee *et al.* 1996).

	Patientes < 10 ans (n = 4)	Lee et al. 1996 (n= 76)	p
Moyenne +/- écart type	0,155 (+/- 0,041)	1,8 (+/- 0,84)	= 0,001

Tableau 12: Analyse statistique réalisée chez les patientes de moins de 10 ans

Chez les patientes âgées de 10 à 15 ans, nous observons également une différence significative ($p < 0.0001$).

	Patientes 10 à 15 ans (n = 9)	Lee et al 1996 (n= 59)	p
Moyenne +/- écart type	0,84 (+/- 1,64)	3,5 (+/- 1,06)	< 0,0001

Tableau 13: Analyse statistique réalisée chez les patientes âgées de 10 à 15 ans

Chez les patientes âgées de plus de 15 ans, nous avons dû retirer de notre étude statistique le dosage d'une de nos patientes. En effet, celle-ci présentait un dosage très élevée d'AMH (> 10 ng/mL) et nous suspectons chez cette patiente un syndrome des ovaires polykystiques.

Après retrait de ce dosage, nous retrouvons une tendance significative ($p = 0.0646$).

	Patientes > 15 ans (n = 6)	Lee et al 1996 (n= 37)	p
Moyenne +/- écart type	0,92 (+/- 1,51)	1,57 (+/- 0,61)	= 0,0646

Tableau 14: Analyse statistique réalisée chez les patientes âgées de plus de 15 ans

G. Evolution :

En juin 2007, 6 patientes étaient décédées, 10 patientes étaient encore en cours de traitement et 34 patientes (soit 68 %) étaient en rémission complète.

Parmi les 34 patientes en rémission complète, 9 avaient un âge inférieur à 12 ans et n'avaient donc pas encore atteint l'âge de la puberté et une patiente n'avait pas été revue en consultation au CHU depuis 1998.

Parmi les 24 autres, 22, c'est à dire un peu plus de 90 %, présentaient une insuffisance ovarienne secondaire au traitement par chimiothérapie ou chimio-radiothérapie, nécessitant un traitement hormonal substitutif. En effet, ces patientes présentaient des taux de FSH compris entre 8.5 et 150 UI/L avec une moyenne de 91.06 +/- 54.89 pour une moyenne d'âge de 21.1 ans +/- 5.94.

Seules deux patientes ont eu une reprise spontanée de leurs menstruations avec des taux de FSH normaux pour leur âge.

Aucune décongélation pour demande d'autogreffe n'a été réalisée à ce jour.

IV. Données du GRECOT de mars 2007 :

Le GRECOT est le Groupe de Recherche et d'Etude de la Cryoconservation Ovarienne et Testiculaire fondé en 1998 par le Docteur Yves Aubard du CHU de Limoges. Un de ses buts est de recueillir les données sur la cryoconservation ovarienne en France.

21 villes en France ont réalisé des autoconservations ovariennes entre 1995 et 2007 : Paris, Nantes, Lille, Clermont-Ferrand, Rouen, Limoges, Toulouse, Caen, Bois Guillaume, Lyon, Marseille, Bordeaux, Amiens, Nancy, Reims, Besançon, Montpellier, Strasbourg, Angers, Saint-Etienne, Nice.

A. Evolution du nombre de prélèvements :

Entre 1995 et 2007, 430 prélèvements ovariens ont été réalisés en France. Une augmentation du nombre de cryoconservation ovarienne a été observée depuis 2000.

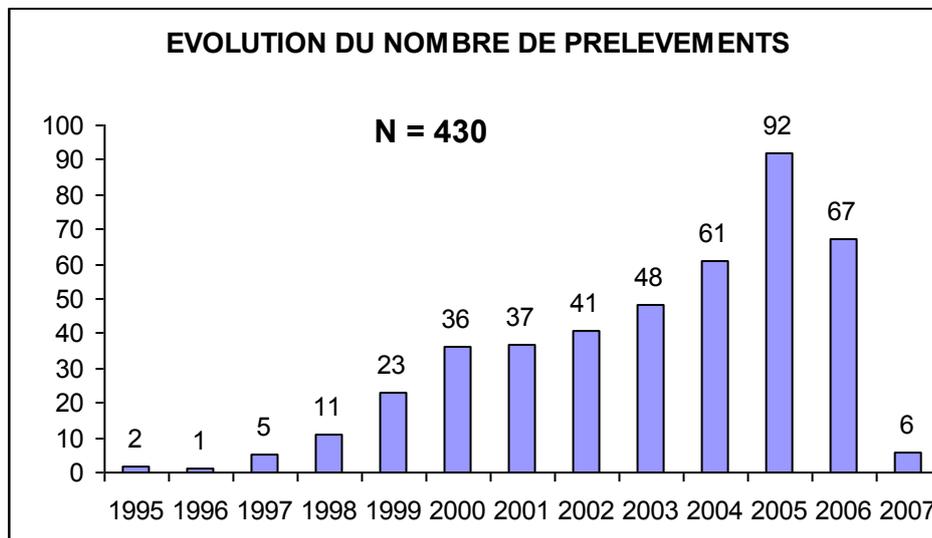


Figure 31: Evolution du nombre de prélèvements ovariens colligés par le GRECOT entre 1995 et 2007.

B. Distribution par groupe d'âge :

La moyenne d'âge au moment du prélèvement était de 17.6 ans +/- 9 ans : 211 patientes avaient 18 ans ou plus, 127 avaient entre 12 et 18 ans et 90 avaient moins de 12 ans.

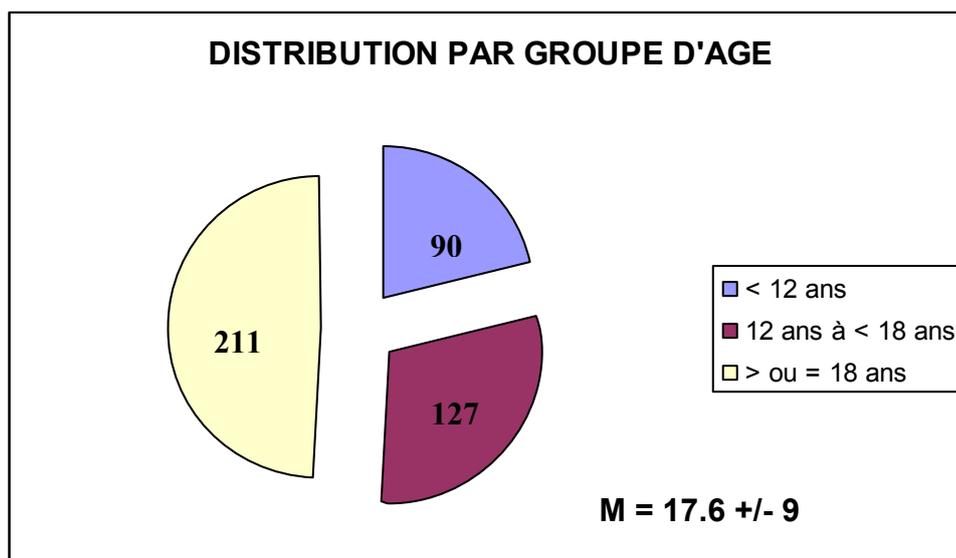


Figure 32: Age des patientes ayant bénéficié d'une cryoconservation ovarienne en France.

C. Indications de cryoconservation ovarienne :

Le prélèvement a été réalisé dans 48 % des cas (n = 208) pour pathologies hématologiques malignes : leucémies aiguës (n = 85), maladie de Hodgkin (n = 75), lymphomes non hodgkiniens (n = 26), myélodysplasie (n = 11), leucémies chroniques (n = 9), myélomes (n = 2).

Il a ensuite été réalisé dans 43 % des cas (n = 183) pour tumeurs solides : tumeurs osseuses (n = 47), tumeurs de l'ovaire (n = 47), neuroblastomes (n = 42), tumeurs du sein (n = 14), tumeurs de l'utérus (n = 12), médulloblastome (n = 9), cancer digestif (n = 5), tumeurs du rein (n = 3), tumeurs cérébrales (n = 2), et autre (n = 2).

Enfin, les pathologies bénignes représentaient près de 9 % des cas (n = 37). Une autoconservation ovarienne a été réalisée devant les pathologies suivantes : drépanocytoses homozygotes SS (n = 15), maladies de système (lupus érythémateux aigue disséminé, panartérite noueuse, maladie de Wegener), thalassémies majeures (n = 4), galactosémie congénitale hétérozygote, maladie de Shwachman, ovotestis, kystes ovariens organiques, déficit immunitaire sévère, néphropathie, maladie de Chediak-Higashi.

D. Distribution des traitements castrateurs :

Un traitement gonadotoxique a été débuté dans près de 61 % des cas avant le prélèvement ovarien (n = 260) : chimiothérapie seule (n = 236), association chimio-radiothérapie (n = 19), radiothérapie seule (n = 5).

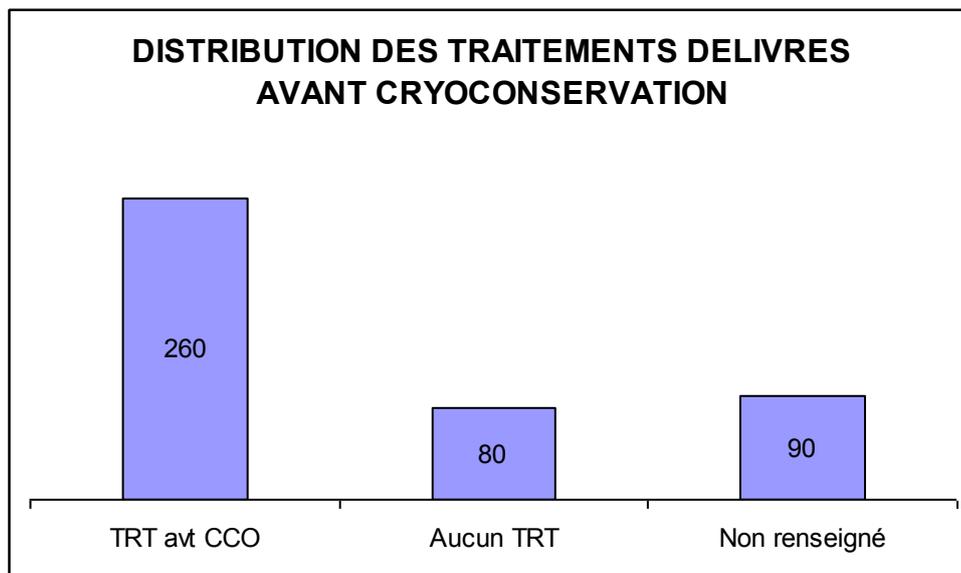


Figure 33: Patientes ayant eu un traitement gonadotoxique avant cryoconservation en France.

Les indications du prélèvement d'ovaire ont été :

- un traitement pré greffe dans 63% des cas
- une chimiothérapie dans 21 % des cas
- une ovariectomie bilatérale dans 9 % des cas

- une chimio-radiothérapie dans 4 % des cas
- une radiothérapie dans 3 % des cas

Partie III

Discussion

Les problèmes éthiques posés par la cryoconservation de tissu ovarien :

Les progrès en cancérologie ayant permis l'amélioration spectaculaire de la survie après cancer, le désir d'enfant et de maternité se sont naturellement imposés chez ces jeunes femmes traitées.

Le cadre légal de la congélation du tissu ovarien, initialement fixé par l'arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en Assistance Médicale à la Procréation, a été revu par la loi relative à la bioéthique adoptée le 6 Août 2004. Celle-ci reconnaît expressément que « en vue de la réalisation ultérieure d'une assistance médicale à la procréation, toute personne peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de son tissu germinale (...), lorsqu'une prise en charge médicale est susceptible d'altérer sa fertilité (...) » (Article L. 2141-11 du code de santé publique).

Les données du GRECOT du mois de mars 2007 nous montrent une évolution importante du nombre de prélèvements réalisés par an en France puisqu'il n'était que de 23 en 1999 et qu'il était de 67 en 2006. Cependant, les indications de prélèvements de tissu ovarien sont elles toujours acceptables ? En effet, au regard de ces données, on s'aperçoit que 12 patientes ont eu une autoconservation ovarienne dans le cadre de cancer de l'utérus. Est-il réellement licite de proposer une cryopréservation ovarienne chez des patientes subissant une hystérectomie totale, dans un pays où les mères porteuses sont interdites ?

La moyenne d'âge de nos patientes étant de 14.1 ans, le consentement pour la réalisation du prélèvement a le plus souvent dû être signé par les parents et non par les patientes elles-mêmes. La prise d'une telle décision, de plus dans un tel contexte, n'est elle pas trop lourde pour ces parents ?

Bien sûr, on peut s'attendre à ce que les parents agissent pour le mieux concernant leur enfant. Cependant, ils peuvent se poser la question de l'intérêt de faire subir à leur enfant un prélèvement ovarien, avec un risque potentiel

chirurgical et anesthésique alors que nous n'avons, à l'heure actuelle, aucune certitude de pouvoir restituer une fertilité à ces patientes dans l'avenir.

Sur les 50 patientes ayant bénéficié d'une cryopréservation ovarienne au CHU de Nantes, il n'a pas été noté de complication opératoire lors du prélèvement d'ovaire. De plus celui-ci a été réalisé, dès que possible, lors d'une laparotomie programmée pour la résection d'une tumeur résiduelle ou au moment d'une anesthésie programmée (pose de cathéter, biopsie médullaire...). Dans ces cas là, l'ovariectomie n'avait pas augmenté la pénibilité de la prise en charge.

Nous savons que lors d'une autogreffe du tissu ovarien congelé, un risque minime mais non nul, variable en fonction du type de pathologie, existe de réintroduire les cellules cancéreuses. L'équipe du Dr Sanchez a d'ailleurs récemment démontré la présence de métastases ovariennes sur 2 biopsies de patientes atteintes de cancer du sein confirmant le risque de réintroduire la maladie lors d'une autogreffe de tissu ovarien (Sanchez, 2007).

Pour évaluer ce risque, une étude histologique est systématiquement réalisée lors du prélèvement sur des fragments de médullaire et de cortex ovarien.

Lors de la congélation du tissu ovarien de nos patientes, la recherche de cellules tumorales a donc systématiquement été réalisée par microscopie optique classique dans le service d'anatomopathologie du CHU de Nantes. Lors de notre étude, nous avons retrouvé deux patientes présentant une infiltration blastique au niveau ovarien ; ces deux patientes étaient atteintes de leucémie aigue, ce qui confirme le risque plus élevé de métastases ovariennes en cas de leucémie aigue (Oktay, 2001).

Le problème est qu'il nous est impossible de réaliser des examens histologiques sur des fragments congelés destinés à être greffés.

Il est donc capital de développer d'autres méthodes sensibles afin de détecter l'évolution de la maladie résiduelle. On pourrait par exemple greffer des fragments de médullaire et de cortex à des souris pour voir si elles développent la pathologie tumorale (Kim *et al.*, 2001). On pourrait encore développer des tests d'amplification génique par PCR pour rechercher les cellules résiduelles. En 1996, Kurokawa montrait déjà la supériorité des techniques de PCR par rapport aux techniques conventionnelles pour la détection de maladie résiduelle au cours de lymphomes (Kurokawa *et al.*, 1996).

Pourrons nous proposer une autogreffe de tissu ovarien en cas d'antécédent de cancer ayant un risque potentiel de métastases ovariennes occultes ?

A ce jour, aucune demande d'autogreffe n' a été réalisée par nos patientes. En cas de demande, une évaluation du risque de réimplantation de la maladie devra être analysée minutieusement et une surveillance oncologique stricte après autogreffe sera indispensable.

Nous pensons que les indications comportant un risque de maladie résiduelle ne doivent pas pour autant être récusées car on peut espérer d'ici une vingtaine d'année le développement de la technique de maturation folliculaire *in vitro*, ce qui permettrait de ne pas avoir recours à l'autogreffe.

Un autre problème important à soulever aujourd'hui est celui des conséquences à long terme sur les naissances issues des techniques d'AMP.

Le débat sur l'augmentation des anomalies de développement chez les enfants issus de multiples méthodes d'AMP (stimulation, FIV, ICSI, maturation ovocytaire *in vitro*...) impose la plus grande circonspection. Plusieurs publications mettent en avant l'augmentation du risque de malformations congénitales après procréation médicalement assistée par rapport aux grossesses spontanées ; ce risque serait augmenté de 30 à 40 % (Hansen *et al.*, 2005) (Olivennes, 2005). Dans le cas de la cryoconservation de fragments ovariens, les lésions potentiellement réalisées sur le tissu gonadique par la manipulation *ex vivo*, les cryoconservateurs, la congélation, la décongélation et l'ischémie prolongée post-greffe, peuvent aussi faire craindre des anomalies dans les processus de maturation de l'ovocyte et une diminution de ses capacités de fécondabilité. De ces manipulations de gamètes *ex vivo* peuvent découler des aberrations chromosomiques ou des anomalies épigénétiques génératrices de fausses couches spontanées ou de malformations congénitales. Un risque accru de syndromes de Wiedemann-Beckwith et, dans une moindre mesure, d'Angelman a été mis en évidence dans plusieurs publications (Maher., 2005, Maher *et al.*, 2003, Sutcliffe *et al.*, 2006).

Le mécanisme principal retrouvé dans ces syndromes correspond à un défaut d'empreinte d'origine maternelle.

Il est donc important de prendre en compte ce risque potentiel d'anomalies dans la descendance des femmes et des fillettes qui bénéficieront d'une greffe de cortex et d'essayer de l'évaluer.

Les résultats de ces publications peuvent paraître inquiétants mais doivent être analysés avec la plus grande attention. En effet, le taux de malformations congénitales retrouvées dans la population globale étant très bas (1 à 3 %), une augmentation de 30 % élève ce taux aux alentours de 1.3 à 3.9 % ; ce qui veut dire que plus de 95 % des enfants naissent sans malformations congénitales (Olivennes, 2005).

Au vu de toutes ces données, de nombreuses questions restent en suspend : quels sont les risques mutagènes au niveau des gamètes et leurs conséquences sur la descendance, des agents toxiques auxquels est exposé le tissu ovarien avant et après la congélation ?

Les indications de cryopréservation du tissu ovarien retenues actuellement sont-elles toutes acceptables d'un point de vue éthique ?

Est-il licite d'envisager une autogreffe de tissu ovarien chez des patientes atteintes de cancer ayant un risque potentiel de métastases ovariennes ?

L'autoconservation ovarienne pose donc actuellement de multiples problèmes éthiques et médicaux auxquels nous devons nous efforcer de répondre. Cependant, cette technique offre au corps médical le moyen de donner de l'espoir en parlant d'avenir et de maternité future à de jeunes patientes touchées par un cancer. Il est également très certainement réconfortant pour ces patientes ainsi que pour leurs parents d'envisager, dès le début d'un traitement lourd, la période de l'« après-cancer » .

Il est donc capital que nous restions honnête vis-à-vis de ces patientes et de leurs parents en insistant sur l'état encore expérimental de cette technique malgré les quelques grossesses et naissances annoncées dans le monde.

Comment améliorer la prise en charge des patientes candidates à la cryopréservation ovarienne ?

De juillet 1995 à juin 2007, 50 patientes ont bénéficié d'une cryopréservation de tissu ovarien au CHU de Nantes. Parmi les 24 patientes actuellement en rémission complète et âgées de plus de 12 ans, 22, c'est à dire un peu plus de 90 %, présentent une insuffisance ovarienne précoce secondaire au traitement. Cette insuffisance ovarienne a été constatée à la fois cliniquement et biologiquement. En effet, un dosage de FSH (Elecsys, Roche) a été réalisé, une fois les patientes en rémission clinique, chez 19 de ces patientes (âgées en moyenne de 21.1 ans +/- 5.94). Celui-ci était compris entre 8.5 et 150 UI/L avec une moyenne de 91.06 +/- 54.89. Ces résultats hormonaux nous confirment donc l'impact majeur des traitements par chimioradiothérapie sur la fonction gonadique de ces jeunes filles et donc l'intérêt capital du développement de la technique de cryopréservation du tissu ovarien.

Le but de notre étude a été d'évaluer la fonction ovarienne de nos patientes au moment de la congélation de leur tissu ovarien afin d'essayer de répondre à certaines interrogations. La cryopréservation du tissu ovarien a-t-elle lieu au meilleur moment ? Ne faudrait-il pas la proposer avant la mise en place de la première ligne de chimiothérapie ?

Actuellement, la cryopréservation est effectuée au moment où les patientes vont devoir débuter un traitement anti-cancéreux castrateur à coup sûr c'est à dire un traitement par irradiation corporelle totale avant allogreffe de moelle osseuse, un traitement par chimiothérapie par des agents alkylants associé à une radiothérapie pelvienne ou une ovariectomie bilatérale. En effet, nous ne voulons pas risquer d'amputer la réserve folliculaire de nos patientes alors que nous n'avons, pour l'instant, aucune certitude de la réussite de l'utilisation de leur tissu ovarien dans le futur. L'indication principale de cryoconservation ovarienne était donc, dans notre service, la réalisation d'une chimiothérapie à forte dose associée à une irradiation corporelle totale avant une greffe de moelle osseuse.

90 % de nos patientes avaient donc reçu une ou plusieurs cures de chimiothérapie, plus ou moins associées à de la radiothérapie, avant le prélèvement du tissu ovarien.

Au vu de nos résultats, nous constatons que 100 % de nos patientes âgées de moins de 10 ans (n=4, avec une moyenne d'âge de 4 ans +/- 3.36) ont un dosage d'AMH inférieur au seuil de détection de notre technique mais également inférieur aux normes retrouvées par l'étude de Lee *et al* (Lee *et al.*, 1996) ainsi que celles retrouvées par l'étude de Lashen (Lashen., 2007).

Une seule de nos patientes âgées de 10 à 15 ans (n=9, avec une moyenne d'âge égale à 13.61 ans +/- 1.72) a un dosage d'AMH supérieur à la moyenne retrouvée lors de l'étude de Lee *et al*.

Enfin, seules deux de nos patientes âgées de plus de 15 ans (n=7, avec une moyenne d'âge de 21 ans +/- 3.6) ont un dosage au dessus des normes présentées par Lee *et al*.

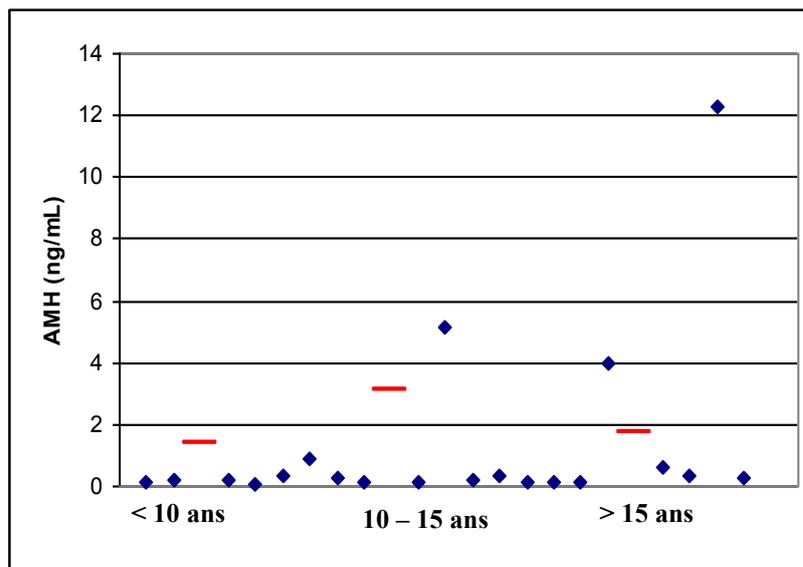


Figure 34: Comparaison des valeurs d'AMH retrouvées chez nos patientes (en bleu) avec celles retrouvées par Lee *et al.* (en rouge) (Lee *et al.*, 1996).

Parmi nos patientes âgées de plus de 15 ans, une présentait un dosage d'AMH très élevé (> 10 ng/mL) et de nombreux kystes sur les coupes de cortex ovarien. Pour ces raisons, nous suspectons chez elle un syndrome des ovaires polykystiques (OPK) et nous avons donc préféré l'exclure de notre étude statistique.

Grâce à l'utilisation du test de Student, nous avons pu confirmer que les différences constatées entre les dosages d'AMH de nos patientes et ceux effectués chez des personnes n'ayant pas reçu de chimiothérapie étaient statistiquement significatives pour les patientes âgées de moins de 10 ans et celles âgées de 10 à 15 ans. Pour les patientes âgées de plus de 15 ans, nous retrouvons une tendance significative avec un $p = 0.0646$.

Il est important de noter que les trois patientes, présentant des valeurs d'AMH supérieures aux moyennes retrouvées dans la population témoin, n'avaient pas reçu de chimiothérapie par des agents alkylants avant la cryopréservation.

De plus, dans un cas, nous avons pu réaliser un dosage d'AMH avant tout traitement par chimiothérapie et un autre après la première cure c'est-à-dire au moment du prélèvement ovarien; ces deux dosages montrent que l'AMH chute dès la première cure de chimiothérapie ainsi que Rosendahl l'avait mis en évidence dans son étude (Rosendahl, 2007).

De nombreuses publications (de Vet *et al.*, 2002) (Deffieux & Antoine, 2003) (Themmen, 2005) ayant mis en évidence le rôle primordial de l'AMH en tant que marqueur de la réserve ovarienne, nous pouvons donc penser que 85 % de nos patientes avaient une réserve ovarienne déjà très altérée, sinon nulle, le jour de la cryoconservation; cela nous invite à croire que la cryopréservation du tissu ovarien devrait être réalisée avant la mise en place du traitement par chimiothérapie, cela bien sûr dans les limites possibles de l'urgence thérapeutique.

Afin de confirmer nos impressions face aux résultats biologiques, nous avons analysé la richesse folliculaire du cortex ovarien de 37 de nos patientes.

Le nombre de follicules primordiaux et primaires retrouvé par mm^2 dans notre étude est tout à fait corrélé à l'âge des patientes, ce qui confirme ce qu'avait montré l'équipe de Poirot *et al.* en 2002 (Poirot *et al.*, 2002).

En effet, l'analyse statistique par le test de Spearman a confirmé l'existence d'une corrélation négative entre l'âge et le compte folliculaire.

N'ayant pu comparer nos résultats avec des normes chez des jeunes filles et femmes non traitées, nous les avons comparés avec ceux retrouvés par Poirot *et al.* (Poirot *et al.*, 2002).

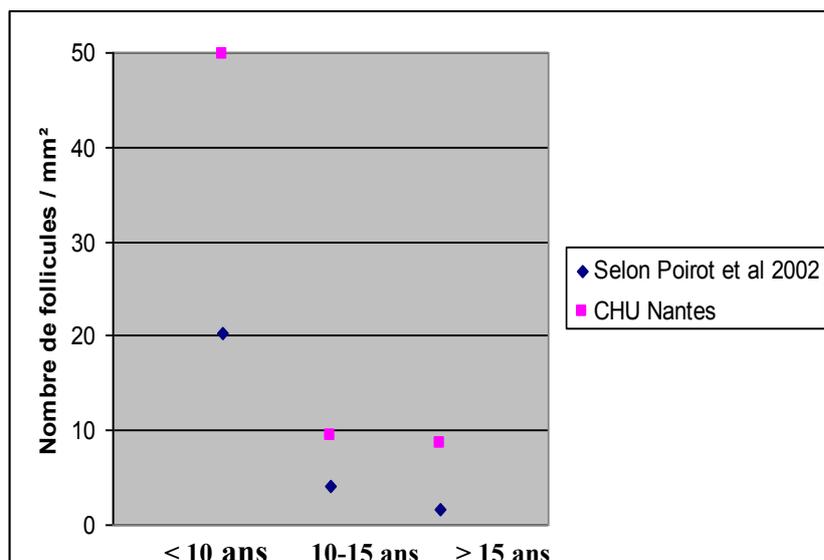


Figure 35: Comparaison du nombre de follicules primordiaux et primaires retrouvé par mm² avec l'étude réalisée par Poirot *et al* en 2002 (Poirot *et al.*, 2002).

Pour chaque groupe de patientes d'âge équivalent, nous retrouvons un nombre de follicules par mm² supérieur à celui retrouvé lors de l'étude de Poirot *et al.*

Selon Poirot *et al.*, le nombre de follicules retrouvé par mm² semble être indépendant des traitements préalables par chimiothérapie (Poirot *et al.*, 2002). Nous n'avons pas pu confirmer cette donnée puisque 90 % de nos patientes avaient reçu de la chimiothérapie avant le prélèvement ovarien.

En analysant nos résultats, nous avons remarqué que parmi les patientes âgées de moins de 7 ans (n=10), 80 % avaient un nombre de follicules primordiaux et primaires supérieur à 20 / mm².

Par contre, seules 14,8 % des patientes de plus de 7 ans avaient un compte folliculaire supérieur à 20 / mm².

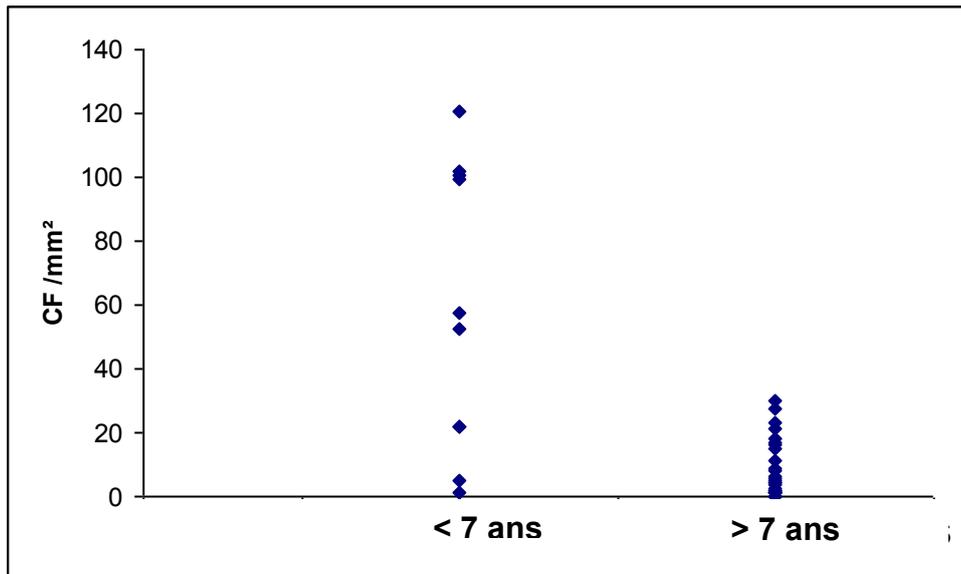


Figure 36 : Compte folliculaire en fonction de l'âge des patientes.

Nous avons donc l'impression que l'âge de 7 ans correspondait à un âge seuil pour notre compte folliculaire.

L'étude statistique par courbe ROC (Receiver Operating Curve) nous a permis de confirmer qu'à l'âge de 7 ans correspondait un compte folliculaire de 20/mm² avec une sensibilité de 67 % et une très bonne spécificité de 92 % (aire sous la courbe = 0,817).

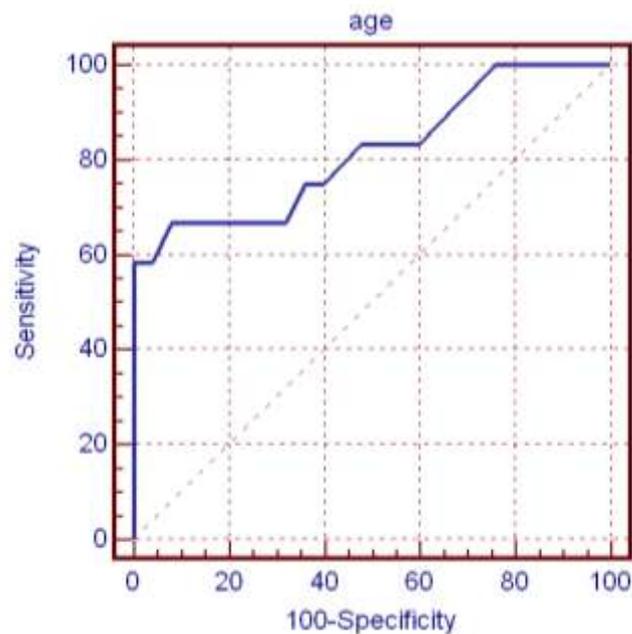


Figure 37 : Courbe ROC

Cependant, il nous était impossible de comparer ce résultat à des normes connues de compte folliculaire par mm² en fonction de l'âge des patientes.

De plus, trois groupes semblaient se détacher de notre analyse :

- Groupe n°1 : groupe de patientes âgées de moins de 10 ans (n= 8) et ayant plus de 20 follicules / mm² (en rouge sur la figure)
- Groupe n°2 : groupe de patientes âgées de plus de 10 ans (n=8) et ayant plus de 10 follicules / mm² (en jaune sur la figure)
- Groupe n°3 : groupe de patientes ayant moins de 10 follicules par mm² quel que soit leur âge (n= 20) (en bleu sur la figure)

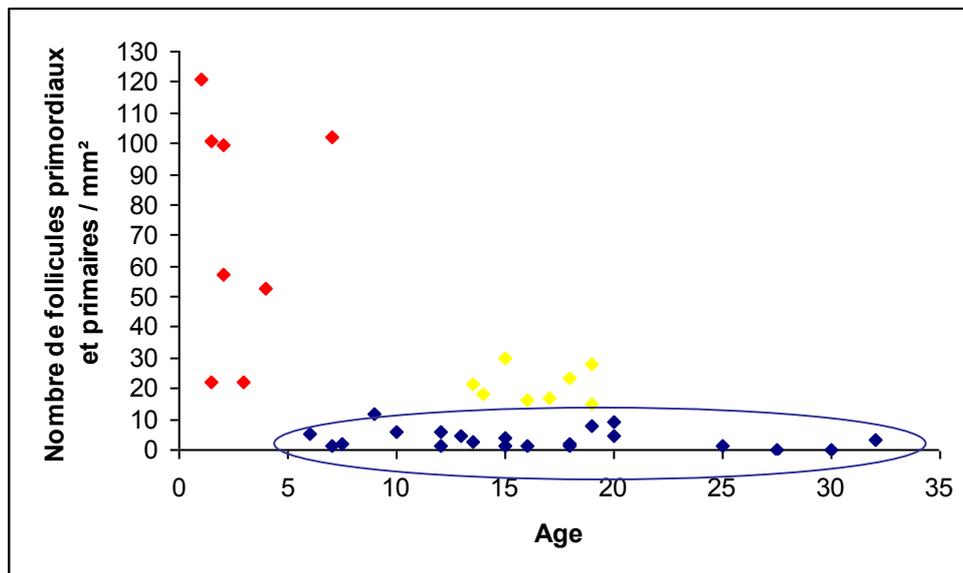


Figure 38: Nombre de follicules primordiaux et primaires retrouvés par mm² dans le cortex ovarien de nos patientes.

Si l'on admet que plus il y a de follicules dans le cortex ovarien, plus les chances de restaurer la fertilité sont grandes, ces chances seraient donc plus importantes pour les petites fillettes en raison du plus grand nombre de follicules présents dans leur cortex (Poirot *et al.*, 2005). Les patientes appartenant aux groupes 1 et 2 de notre étude auraient donc plus de chance de récupérer une fonction ovarienne après greffe de tissu ovarien, greffe réalisée uniquement après s'être assuré de l'absence de métastases ovariennes.

Par contre, pour les patientes appartenant au groupe 3, leur chance de récupérer une fonction ovarienne grâce à la cryopréservation ovarienne nous paraît faible, cela dans les limites bien sûr de nos connaissances actuelles.

De plus, plusieurs questions fondamentales restent aujourd'hui en suspend : ces follicules primordiaux et primaires retrouvés dans leur cortex ovarien sont-ils de bonne qualité ? Pourront-ils un jour, suite à une greffe de fragments ovariens, devenir des follicules préantraux puis antraux et sécréter à nouveau de l'AMH ?

Auraient-ils été plus nombreux et de meilleure qualité si la cryopréservation avait eu lieu avant le début du traitement par chimioradiothérapie ?

En 2005, Meirou a rapporté la deuxième naissance suite à une cryopréservation ovarienne réalisée chez une patiente de 28 ans ayant été traitée pour un lymphome. Cette patiente avait reçu plusieurs cures de chimiothérapie avant la réalisation du prélèvement de tissu ovarien pour cryopréservation. Deux ans après la fin de son traitement, la patiente, désireuse d'obtenir une grossesse, a bénéficié d'une greffe de tissu ovarien. Avant la greffe, plusieurs bilans hormonaux montraient des taux de FSH très élevés (entre 40 et 104 UI/L) et le dosage d'AMH était indétectable. Six mois après la greffe, un nouveau dosage d'AMH mettait en évidence un taux à 5,3 ng/mL confirmant la présence de follicules en croissance.

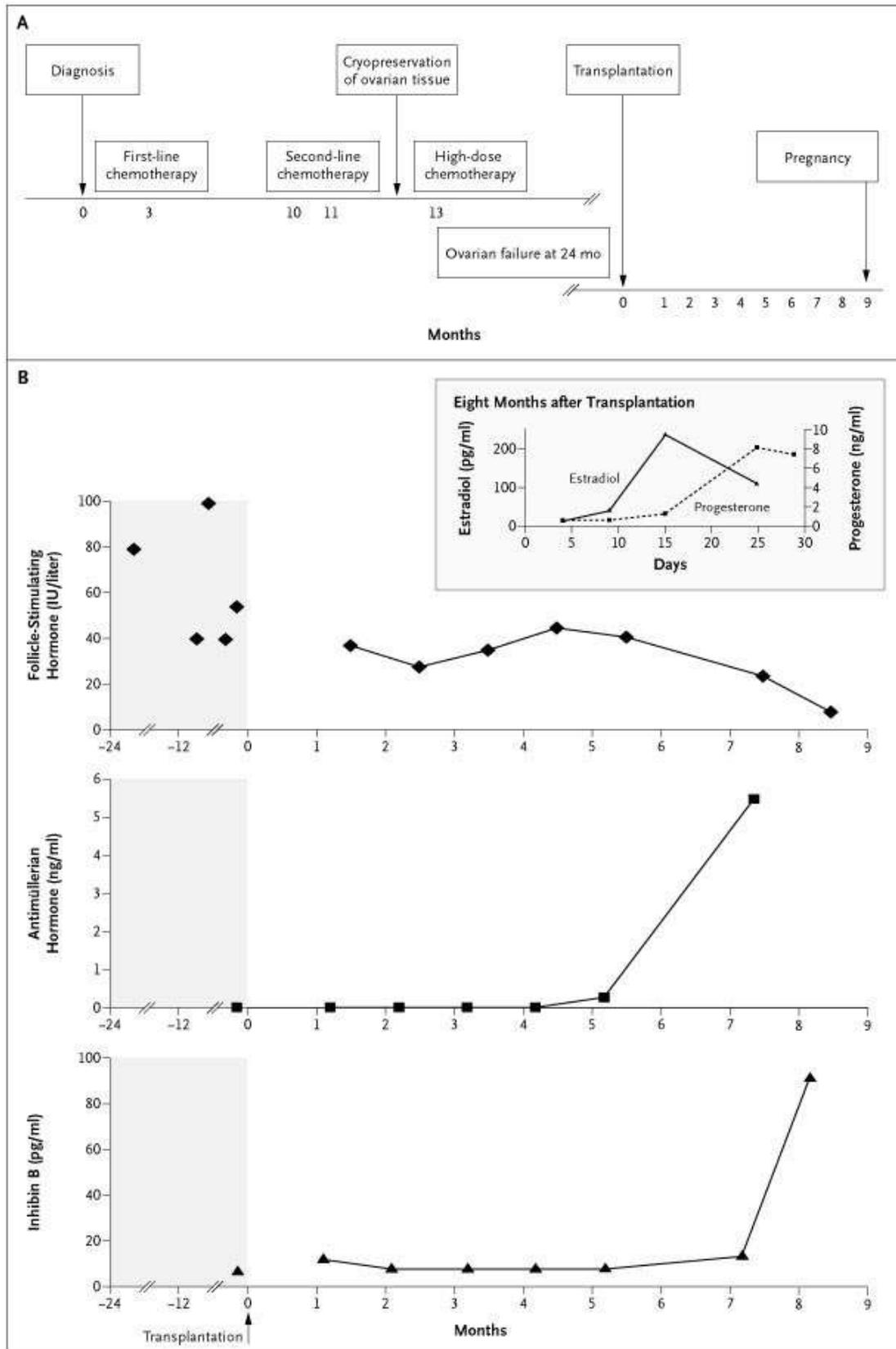


Figure 39: Résultats des bilans hormonaux effectués après greffe du tissu ovarien lors de l'étude de Meirou (Meirou *et al.*, 2005).

Cette étude est la seule que nous avons retrouvée dans la littérature montrant une réaugmentation de l'AMH après greffe de tissu ovarien.

De plus, Choi *et al.* ont suggéré, chez la souris, que des phénomènes d'apoptose et de nécrose suite à la congélation-décongélation du cortex ovarien altéraient les capacités de développement des follicules primordiaux en follicules primaires et secondaires (Choi *et al.*, 2007).

Des études complémentaires restent donc nécessaires afin de confirmer la possible reprise des cycles ovariens par les follicules primordiaux ainsi que la remontée possible de l'AMH après greffe de tissu ovarien.

Nous espérons également pouvoir répondre à ces interrogations le jour où certaines de nos patientes émettront le souhait de bénéficier d'une greffe de leur tissu ovarien en vue d'obtenir une grossesse. Le jour où nous réaliserons des greffes de tissu ovarien congelé, il serait intéressant de suivre la reprise de leurs cycles menstruels par la réalisation d'échographies et de bilans hormonaux .

De plus, le jour où nous décongèlerons des fragments ovariens, il serait également intéressant que nous réalisions à nouveau un compte folliculaire / mm² afin de confirmer, ou non, la justesse de notre protocole de congélation. Nous espérons retrouver un taux de follicules intacts après décongélation équivalent à celui retrouvé par Newton, c'est à dire aux alentours de 74 % (Newton *et al.*, 1996). Afin d'évaluer les effets de la congélation sur le cortex ovarien, nous pourrions également nous inspirer de tests de viabilité folliculaire (tests au bleu trypan) ou d'examen histologiques décrits en recherche expérimentale (Courbiere *et al.*, 2005, Demirci *et al.*, 2001) (Fauque *et al.*, 2007).

La cryopréservation ovarienne est un formidable pari sur l'avenir. Les progrès de la science permettront peut-être à de nombreuses jeunes femmes traitées pour cancer pendant l'enfance et atteintes d'une insuffisance ovarienne précoce de ne pas avoir à recourir pour leur futur projet parental à un don d'ovocyte ou à l'adoption. Ces dernières années ont vu, depuis la naissance de la première brebis après autogreffe ovarienne en 1994 (Gosden *et al.*, 1994), de nombreuses avancées aboutissant à la première naissance humaine en 2004 (Donnez *et al.*, 2004). Etant donné les nombreux travaux en cours, on peut

espérer d'ici une dizaine d'année que la recherche expérimentale et clinique aura apporté de nombreuses réponses à toutes nos questions.

Conclusion

La pathologie maligne de l'enfant avant 15 ans représente 1% de l'ensemble des cancers, correspondant à 110 à 130 nouveaux cas pour un million d'enfants de moins de 15 ans par an (Bergeron & Philip, 2004).

Les traitements intensifs incluant la radiothérapie et la chimiothérapie ont considérablement amélioré le pronostic des jeunes patientes atteintes de cancer. En effet, une étude a montré que le taux de survie à 5 ans après cancer chez les adolescents âgés de 15 à 19 ans était de 73 % en Europe et de 78 % aux Etats-Unis ; chez les enfants il était de 72 % en Europe et de 75 % aux Etats-Unis. (Desandes, 2007).

L'augmentation des taux de survie de ces jeunes patientes fait que leur fertilité future ne doit plus être une préoccupation secondaire pour les oncologues. Il semble maintenant qu'il soit très important et éthique de leur proposer une cryopréservation de tissu ovarien.

La cryopréservation ovarienne n'en est qu'à ses débuts en médecine humaine mais l'annonce récente de deux naissances dans l'espèce humaine suite à une cryopréservation et greffe ovarienne a été porteuse de beaucoup d'espoir.

Actuellement, cette technique reste encore expérimentale puisque ni les protocoles de congélation, ni le mode d'utilisation du tissu ovarien après décongélation ne sont à ce jour consensuels. Heureusement, la plupart de nos patientes étant encore mineures, leur désir de grossesse ne surviendra pour la plupart que dans une dizaine d'année. D'ici là, nous pouvons espérer que la recherche fondamentale aura permis d'évoluer de manière importante dans les deux domaines porteurs d'espoir : la greffe ovarienne et la maturation folliculaire *in vitro*. Nous pouvons également espérer que d'autres études cliniques viendront nous éclairer sur le moment idéal pour réaliser le prélèvement de tissu ovarien afin de donner le maximum de chance à ces jeunes patientes de préserver leur fertilité dans les meilleures conditions possibles.

ANNEXES

Annexe 1 :

Cas	Age	Pathologie	Trt avant CCO	Type de traitement gonadotoxique délivré avant CCO	dont Alkylants	Trt après CCO	Devenir
1	24	LAL	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
2	16	Kystes ovariens	Non			Non	RC
3	4	Néphroblastome	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
4	20	Sarcome Ewing	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	DCD
5	29	LMC	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
6	32	Myélome	Non			Oui	RC
7	16	LAM	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
8	6	Lymphome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
9	17	Maladie Hodgkin	Oui	Chimio-radiothérapie	Non	Oui	RC
10	1,5	LAM	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
11	14	LAL	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	RC
12	30	Maladie Hodgkin	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
13	20	LAL	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
14	7,5	LAL	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	DCD
15	13	Maladie Hodgkin	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
16	14,5	Maladie Hodgkin	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
17	7	LAL	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	DCD
18	1,5	LAL	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	DCD
19	7	LAM	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
20	7	LAM	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
21	18	Maladie Hodgkin	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	RC
22	13,5	Rhabdomyosarcome	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	RC
23	13,5	Sarcome Ewing	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
24	18	Maladie Hodgkin	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
25	4	Neuroblastome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
26	12	Maladie Hodgkin	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
27	14	Lymphome	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	RC
28	15	Sarcome Ewing	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
29	2	Neuroblastome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
30	15	Lymphome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
31	9	Lymphome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
32	19	LAM	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
33	4	Chediack	Non			Oui	RC
34	18	LAL	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	DCD
35	10	LAL	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	DCD
36	3	LAL	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
37	16	Maladie Hodgkin	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
38	12	LAL	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	RC
39	2	Neuroblastome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	RC
40	25	Gliome	Non			Oui	en cours
41	18	Ostéosarcome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	en cours
42	15	LAM	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	RC
43	15	Sarcome Ewing	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	en cours
44	13	Neuroblastome	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	en cours
45	27,5	Maladie Hodgkin	Oui	Chimio-radiothérapie	Oui	Oui	en cours

46	1	LAM	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	en cours
47	21	LAL	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	en cours
48	19	Maladie Hodgkin	Oui	Chimiothérapie	Oui	Oui	en cours
49	19	Lymphome	Non			Oui	en cours
50	27,5	LAM + tératome	Oui	Chimiothérapie	Non	Oui	en cours

Tableau 15 : Principales caractéristiques des 50 patientes suivies lors de notre étude

Annexe 2 :

AUTEURS	INDICATION	AGE	TECHNIQUE DE GREFFE	REPRISE FONCTION OVARIENNE	DEVENIR APRES GREFFE
Oktay, 2000	Métrorragies	29 ans	Orthotopique	4 MAT	Cycles menstruels
Radford <i>et al</i> , 2001	Maladie Hodgkin	36 ans	Orthotopique	7 MAT	Cycles menstruels
Kim <i>et al</i> , 2004	Cancer du col utérin	37 ans	Hétérotopique	3,5 MAT	Cycles menstruels
Oktay <i>et al</i> , 2004	Cancer du sein	30 ans	Hétérotopique	3 MAT	Embryon à 4 cellules après FIV
Schmidt <i>et al</i> , 2004	Maladie Hodgkin	32 ans	Orthotopique	2 MAT	Cycles menstruels Echec de FIV
Donnez <i>et al</i> , 2004	Maladie Hodgkin	25 ans	Orthotopique	5 MAT	Grossesse spontanée 11 mois après greffe; Naissance
Meirow <i>et al</i> , 2005	Lymphome non Hodgkinien	28 ans	Orthotopique	8 MAT	Grossesse par FIV 9 mois après greffe; Naissance
Schmidt <i>et al</i> , 2005	Maladie Hodgkin	28 ans	Orthotopique et Hétérotopique	5 MAT	Cycles menstruels
Schmidt <i>et al</i> , 2005	Maladie Hodgkin	25 ans	Orthotopique et Hétérotopique	4, 5 MAT	Embryon à 2 cellules après FIV
Schmidt <i>et al</i> , 2005	Lymphome non Hodgkinien	32 ans	Orthotopique	2 MAT	Embryon à 4 cellules après FIV
Wolner-Hanssen <i>et al</i> , 2005	Anémie érythroblastique	30	Hétérotopique	4,5 MAT	Développement folliculaire après stimulation locale
Donnez <i>et al</i> , 2006	Drepanocytose homozygote	21	Orthotopique	4,5 MAT	Cycles menstruels
Rosendahl 2006	Maladie Hodgkin	28 ans	Orthotopique et Hétérotopique	4,5 mois	Grossesse biochimique après ponction d'un follicule issu de greffe hétérotopique
Demeestere <i>et al</i> , 2006	Maladie Hodgkin	24 ans	Orthotopique et Hétérotopique	5 mois	Grossesse spontanée mais fausse couche
Demeestere <i>et al</i> , 2007	Maladie Hodgkin	24 ans	Orthotopique et Hétérotopique	5 mois	Grossesse en cours
Andersen 2007					Grossesse en cours

Tableau 16: Résumé des cas de cryoconservation et de greffe de cortex ovarien chez la femme ; d'après Courbière *et al.* (Courbière *et al.*, 2007).

MAT : mois après transplantation

Annexes 3 : Formulaire de consentement

« Protocole de prélèvement de tissu ovarien chez des patientes soumises à un traitement castrateur »

Formulaire de consentement d'une patiente majeure

Je soussignée, Madame, Mademoiselle (1)
accepte que mon tissu ovarien soit prélevé et congelé de manière à m'être ultérieurement restitué quand je le souhaiterai à ma demande dans le cadre d'un futur projet parental. J'ai bien compris que la réalisation de cette greffe ou l'éventuel recours à la maturation in vitro ne se fera qu'avec l'accord des médecins oncologues, gynécologues et biologistes de la reproduction.

J'ai bien compris l'information orale qui m'a été donnée par le Docteur....., concernant le déroulement de cette procédure et notamment, les bénéfices attendus, les risques et désagréments inhérents à cette technique.

Je suis libre d'accepter ou de refuser de réaliser cette conservation, sans que cela nuise à la qualité des soins qui me sont prodigués.

Je suis libre de demander à tout moment la destruction du tissu ovarien cryopréservé.

J'accepte que des informations me concernant soient collectées et que ces dernières fassent l'objet d'un traitement informatisé. Ces données demeureront strictement confidentielles et j'autorise leur consultation par des personnes collaborant à la prise en charge, éventuellement par un représentant des autorités de santé, toutes ces personnes étant astreintes au secret professionnel.

Je bénéficie en outre, d'un droit d'accès et de rectification, aux informations me concernant (article 40 de la loi « informatique et liberté », celui-ci s'exerçant à tout moment, par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix.

Dans l'hypothèse où je n'aurais plus besoin mon tissu ovarien ou en cas de décès :

je souhaite que mon tissu ovarien soit détruit (2)

j'autorise que ce tissu soit utilisé à des fins de recherche biologique (sans que des embryons puissent être générés à partir de ce tissu) (2)

Fait à Nantes, le _____

La patiente

Madame, Mademoiselle,

Nom : _____

Prénom : _____

Signature obligatoire :

Le médecin de la reproduction

Docteur, Professeur, (1)

Nom : _____

Prénom : _____

Signature obligatoire :

(1) rayer la mention utile

(2) cocher la case correspondante

**« Protocole de prélèvement de tissu ovarien chez des patientes soumises
à un traitement castrateur »**

Formulaire de consentement d'une patiente mineure

Nous soussignons,

Monsieur _____

et Madame, Mademoiselle

(1) _____

Père, Mère, tuteurs (1), titulaires de l'autorité parentale auprès de :

Mademoiselle _____

acceptons que le tissu ovarien de notre fille soit prélevé et congelé de manière à lui être ultérieurement restitué quand elle le souhaitera à sa demande dans le cadre d'un futur projet parental. Nous avons bien compris que la réalisation de cette greffe ou l'éventuel recours à la maturation in vitro ne se fera qu'avec l'accord des médecins oncologues, gynécologues et biologistes de la reproduction.

Nous avons bien compris l'information orale qui nous a été donnée par le Docteur _____, concernant le déroulement de cette procédure et notamment, les bénéfices attendus, les risques et désagréments inhérents à cette technique.

Nous et notre enfant, sommes libres d'accepter ou de refuser de réaliser cette conservation, sans que cela nuise à la qualité des soins qui lui sont prodigués.

Nous et notre enfant, sommes libres de demander à tout moment la destruction du tissu ovarien cryopréservé.

Nous acceptons que des informations concernant notre enfant soient collectées et que ces dernières fassent l'objet d'un traitement informatisé. Ces données demeureront strictement confidentielles et nous n'autorisons leur consultation que par des personnes collaborant à la prise en charge, éventuellement par un représentant des autorités de santé, toutes ces personnes étant astreintes au secret professionnel.

Nous bénéficions en outre, d'un droit d'accès et de rectification, aux informations concernant notre fille (article 40 de la loi « informatique et liberté », celui-ci s'exerçant à tout moment, par l'intermédiaire d'un médecin de notre choix.

Dans l'hypothèse où notre enfant n'aurait plus besoin de son tissu ovarien ou en cas de décès :

je souhaite que son tissu ovarien soit détruit (2)

j'autorise que ce tissu soit utilisé à des fins de recherche biologique (sans que des embryons puissent être générés à partir de ce tissu) (2)

Fait à Nantes, le _____

Le Père ou le Tuteur, titulaire de l'autorité parentale

Père, Tuteur de l'enfant (1)

Nom : _____

Prénom : _____

Signature obligatoire :

La patiente mineure

Mademoiselle,

Nom : _____

Prénom : _____

Signature obligatoire :

La Mère de la patiente, titulaire de l'autorité parentale

Madame, Mademoiselle, (1)

Nom : _____

Prénom : _____

Signature obligatoire :

Le médecin de la reproduction

Docteur, Professeur, (1)

Nom : _____

Prénom : _____

Signature obligatoire :

(3) rayer la mention utile

(4) cocher la case correspondante

**Ovarian tissue cryopreservation in young women and prepubertal girls
treated for cancer: effect of first line chemotherapy in 50 patients**

Septembre 2007. Boston.

Ovarian tissue cryopreservation in young women and prepubertal girls treated for cancer: effect of first line chemotherapy in 50 patients.

Sophie Mirallié¹, Marie Loosveld¹, Marie Laure Langlois¹, Marc David Leclair², Françoise Méchinaud², Thomas Dejoie⁴, Damien Masson¹, Thomas Fréour³, Christian Laboisse⁵, Miguel Jean¹, Paul Barrière¹
 1: Medicine and Biology of Reproduction Unit, CHU Nantes; 2: Pediatric Surgery, CHU Nantes; 3: Pediatric Oncology, CHU Nantes; 4: Laboratory of Biochemistry, CHU Nantes; 5: Laboratory of Anatomopathology, CHU Nantes. FRANCE

Objective:

As infertility can have a particularly devastating impact in the later life of surviving cancer patients, cryopreservation of ovarian tissue was proposed by oncologists to store gametes of young patients at high risk of premature ovarian failure, consecutive of oncologic treatment. Between July 1996 and June 2007, ovarian tissue cryopreservation was performed in 50 young women and girls in our center. The tissue was frozen by a slow cooling technique using DMSO and sucrose as cryoprotectants, as previous described by Gosden *et al.*, 1994. The aim of the study is to evaluate if ovarian cortex cryopreservation takes place at the best time in patient's treatment (after enhancement chemotherapy) in order to lead to most efficient ovarian reserve preservation.

Material and methods:

The 50 patients were aged from 8 months to 32 years (mean 14.1 +/- 8 years) and 33 were under 18 years old. 72% had malignant haematologic disease, 24% had solid tumour, 4% had non malignant disease. 90% have previously received chemotherapy and 73% (33/45) received alkylating agents. Ovarian cortex histology was performed in all patients (the number of primordial and primary follicles per mm² was measured within the ovarian cortex). The follicles were classified according to the modified Oktay system (Oktay *et al.*, 1998). The last 20 patients had Anti Mullerian Hormon (AMH) serum level measurement at time of cryopreservation as an indirect assessment of the ovarian pool (Beckman Coulter, Immunotech, France). In order to establish ovarian status after completion of cancer treatment, we therefore assessed FSH level, in patients with complete remission aged more 12 years and without substitutive hormonal treatment (Eli Lilly, Roche, France) n=24.

Results:

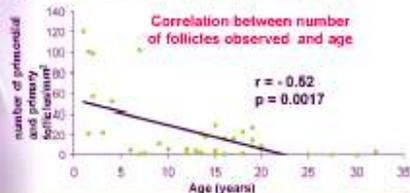
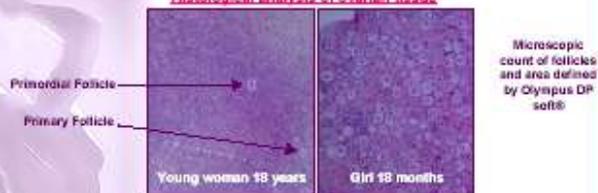
◊**Histological analysis of ovarian tissue(I):** The total number of primordial and primary follicles per mm² was dependent of the age of patients as described by Poirot *et al.*, 2002.

In patients aged under 10 years the mean number of follicles was 49.7 +/- 45.29 (n=16, mean age was 4.43 +/- 2.61). Between 10 and 16 years old, it was 9.46 +/- 10.02 (n=14, mean age was 13.53 +/- 1.46), and in the older group, 8.64 +/- 9.04, (n=21, mean age 21.42 +/- 5.06).

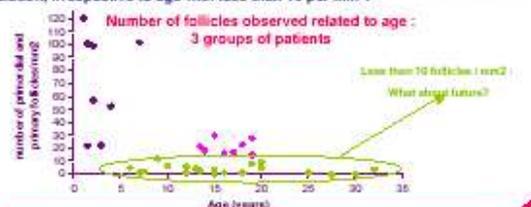
No count was possible for 26% (13/50) of histological analysis according to bad quality.

We analyse the number of follicles related to age of patient. The median of follicle number per mm² in our study is 8.04 and the median of age is 14.1 years.

Histological analysis of ovarian tissue



◊**Histological analysis of ovarian tissue(II):** 3 groups of patients were observed: young patients <10 years with more than 20 follicles per mm², patients over 10 years with more than 10 follicles per mm², and the others patients, 64% of total population, irrespective to age with less than 10 per mm².



◊**AMH levels:** At time of cryopreservation, 75% (n=15) of the patients had AMH level < 0.38 ng/mL (detection cut-off of the technique) and 16% (n=3) had AMH ≥ 2 ng/mL (lower value of normal level), none of these 3 patients received alkylating drugs.



◊**FSH levels:** 92% of the patients present premature ovarian failure after treatment: FSH mean was 91.1 UI/L +/- 84.6 (8.5-150). The mean age at FSH assessment is 21.1 +/- 5.9 years old.

Discussion and conclusion:

POF's risk of treatment was well evaluated at time of cryopreservation and confirmed its interest as a large proportion of patients have assessed ovarian failure after treatment.

We showed a good correlation between follicles number and age. It confirmed previous study that showed that the total number of follicles per mm² seemed to be independent of previous chemotherapy but only reliable with age (Poirot *et al.*, 2002).

Otherwise, it's well known that the size of the follicle pool declines with increasing age.

But, what about the quality of the ovarian follicle pool after chemotherapeutic treatment?

As AMH is expressed in granulosa cells of growing non selected follicles, it's an ideal marker of the ovarian follicle pool. AMH levels from infancy to adulthood has been assessed (Lee *et al.*, 1996) and showed a lowest level at birth with and increase throughout prepubertal years (confirmed by Lashen, 2007). In adulthood, it'll decrease as a sign of follicular reserve exhaustion, previous to FSH incrementation, as a marker of ovarian ageing (de Vet *et al.*, 2002).

The very low levels observed in our study are reliable to chemotherapy, which has been proved (in adult) to induce a drop in AMH level one week after the first serie of chemotherapy with an ongoing drop along the other series (Rosendahl, 2007).

Ovarian first line cryopreservation should probably be performed earlier in cancer treatment, before chemotherapy, in order to consider important AMH drop induced by chemotherapy and preserve best quality ovarian tissue. Further studies are needed to optimize counselling.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abir, R., Franks, S., Mobberley, M. A., Moore, P. A., Margara, R. A. & Winston, R. M. (1997). Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertil Steril* **68**, 682-8.
- Andersen C., L. A., Ernst E., Nyboe Andersen A., Rosendahl M. (2007). Assisted reproductive techniques after autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue.
- Ataya, K. & Moghissi, K. (1989). Chemotherapy-induced premature ovarian failure: mechanisms and prevention. *Steroids* **54**, 607-26.
- Ataya, K., Pydyn, E., Ramahi-Ataya, A. & Orton, C. G. (1995a). Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonists?: Preliminary observations. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 790-5.
- Ataya, K., Rao, L. V., Lawrence, E. & Kimmel, R. (1995b). Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod* **52**, 365-72.
- Aubard, Y. (2003). Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **108**, 14-8.
- Aubard, Y., Lavignac, C., Grandjean, M. H., Piver, P. & Teissier, M. P. (1996). [Orthotopic autografts of ovarian slices in pregnant rats]. *Contracept Fertil Sex* **24**, 852-5.
- Aubard, Y., Piver, P., Cogni, Y., Fermeaux, V., Poulin, N. & Driancourt, M. A. (1999). Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod* **14**, 2149-54.
- Aubard, Y., Poirot, C. & Piver, P. (2002). [Cryopreservation of ovarian tissue]. *Gynecol Obstet Fertil* **30**, 358-66.
- Bath, L. E., Wallace, W. H., Shaw, M. P., Fitzpatrick, C. & Anderson, R. A. (2003). Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* **18**, 2368-74.
- Bedaiwy, M. A., Hussein, M. R., Biscotti, C. & Falcone, T. (2006). Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle. *Hum Reprod* **21**, 3258-69.
- Bergeron, C. & Philip, T. (2004). [Childhood cancer. Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic aspects]. *Rev Prat* **54**, 1489-95.
- Blumenfeld, Z., Avivi, I., Linn, S., Epelbaum, R., Ben-Shahar, M. & Haim, N. (1996). Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Hum Reprod* **11**, 1620-6.
- Blumenfeld, Z., Avivi, I., Ritter, M. & Rowe, J. M. (1999). Preservation of fertility and ovarian function and minimizing chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women. *J Soc Gynecol Investig* **6**, 229-39.
- Byrne, J., Fears, T. R., Gail, M. H., Pee, D., Connelly, R. R., Austin, D. F., Holmes, G. F., Holmes, F. F., Latourette, H. B., Meigs, J. W. & et al. (1992). Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol* **166**, 788-93.
- Carroll, J. & Gosden, R. G. (1993). Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod* **8**, 1163-7.
- Carroll, J., Whittingham, D. G., Wood, M. J., Telfer, E. & Gosden, R. G. (1990). Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil* **90**, 321-7.

- Cha, K. Y., Han, S. Y., Chung, H. M., Choi, D. H., Lim, J. M., Lee, W. S., Ko, J. J. & Yoon, T. K. (2000). Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **73**, 978-83.
- Cha, K. Y., Koo, J. J., Ko, J. J., Choi, D. H., Han, S. Y. & Yoon, T. K. (1991). Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* **55**, 109-13.
- Chang, M. Y., Chiang, C. H., Hsieh, T. T., Soong, Y. K. & Hsu, K. H. (1998). Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* **69**, 505-10.
- Chemaitilly, W., Mertens, A. C., Mitby, P., Whitton, J., Stovall, M., Yasui, Y., Robison, L. L. & Sklar, C. A. (2006). Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1723-8.
- Chen, C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* **1**, 884-6.
- Chiarelli, A. M., Marrett, L. D. & Darlington, G. (1999). Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada. *Am J Epidemiol* **150**, 245-54.
- Choi, J., Lee, J. Y., Lee, E., Yoon, B. K., Bae, D. & Choi, D. (2007). Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology* **54**, 55-62.
- Commenges-Ducos, M. (2002). [What medical intervention in the late desire for a child?]. *Gynecol Obstet Fertil* **30**, 834-8.
- Courbiere, B., Massardier, J., Salle, B., Mazoyer, C., Guerin, J. F. & Lornage, J. (2005). Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil Steril* **84 Suppl 2**, 1065-71.
- Courbiere, B., Provansal, M., Saias-Magnan, J., Guillemain, C., Noizet, A., Grillo, J. M. & Gamberre, M. (2007). [What are at present the real hopes of pregnancy after ovarian cryopreservation?]. *Gynecol Obstet Fertil* **35**, 666-677.
- Critchley, H. O. & Wallace, W. H. (2005). Impact of cancer treatment on uterine function. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 64-8.
- de Vet, A., Laven, J. S., de Jong, F. H., Themmen, A. P. & Fauser, B. C. (2002). Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* **77**, 357-62.
- Deffieux, X. & Antoine, J. M. (2003). [Inhibins, activins and anti-Mullerian hormone: structure, signalling pathways, roles and predictive value in reproductive medicine]. *Gynecol Obstet Fertil* **31**, 900-11.
- Demeestere, I., Simon, P., Buxant, F., Robin, V., Fernandez, S. A., Centner, J., Delbaere, A. & Englert, Y. (2006). Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod* **21**, 2010-4.
- Demeestere I., S. P., Emiliani S., Delbaere A., Englert Y. (2007). Ongoing pregnancy after a second cryopreserved ovarian tissue transplantation procedure.
- Demirci, B., Lornage, J., Salle, B., Frappart, L., Franck, M. & Guerin, J. F. (2001). Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* **75**, 754-62.

- Depalo, R., Loverro, G. & Selvaggi, L. (2002). In vitro maturation of primordial follicles after cryopreservation of human ovarian tissue: problems remain. *Med Pediatr Oncol* **38**, 153-7.
- Desandes, E. (2007). Survival from adolescent cancer. *Cancer Treat Rev*.
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B. & van Langendonck, A. (2004). Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* **364**, 1405-10.
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B. & Van Langendonck, A. (2006). Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. *Hum Reprod* **21**, 183-8.
- Ebrard-Charra, S., Reyftmann, L., Hedon, B. & Dechaud, H. (2005). [Ultrasonographical predictive factors of ovarian response to stimulation prior to in vitro fertilization]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 762-7.
- Eppig, J. J. & O'Brien, M. J. (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* **54**, 197-207.
- Erickson, G. F. & Danforth, D. R. (1995). Ovarian control of follicle development. *Am J Obstet Gynecol* **172**, 736-47.
- Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M. R., Seracchioli, R., Ciotti, P. M., Magrini, O., Venturoli, S. & Flamigni, C. (1998). Oocyte cryopreservation. *Hum Reprod* **13 Suppl 4**, 98-108.
- Fabbri, R., Venturoli, S., D'Errico, A., Iannascoli, C., Gabusi, E., Valeri, B., Seracchioli, R. & Grigioni, W. F. (2003). Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecol Oncol* **89**, 259-66.
- Faddy, M. J. & Gosden, R. G. (1996). A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod* **11**, 1484-6.
- Faddy, M. J., Gosden, R. G., Gougeon, A., Richardson, S. J. & Nelson, J. F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* **7**, 1342-6.
- Fanchin, R., Schonauer, LM, Righini, C, Guibourdenche, J., Frydman, R, Taieb, J. (2003) Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum.Reprod* **2**, 323-7.
- Fauque, P., Ben Amor, A., Joanne, C., Agnani, G., Bresson, J. L. & Roux, C. (2007). Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertil Steril* **87**, 1200-7.
- Fenichel, P. (2005). [Medical preservation of ovarian function before and during radiochemotherapy]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 610-4.
- Feyereisen, E., Mendez Lozano, D. H., Taieb, J., Hesters, L., Frydman, R. & Fanchin, R. (2006). Anti-Mullerian hormone: clinical insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. *Reprod Biomed Online* **12**, 695-703.
- Freour, T., Mirallie, S., Colombel, A., Bach-Ngohou, K., Masson, D. & Barriere, P. (2006). Anti-mullerian hormone: clinical relevance in assisted reproductive therapy. *Ann Endocrinol (Paris)* **67**, 567-74.
- Goldhirsch, A., Gelber, R. D. & Castiglione, M. (1990). The magnitude of endocrine effects of adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer patients. The International Breast Cancer Study Group. *Ann Oncol* **1**, 183-8.

- Gook, D. A., Edgar, D. H. & Stern, C. (1999). Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Hum Reprod* **14**, 2061-8.
- Gook, D. A., McCully, B. A., Edgar, D. H. & McBain, J. C. (2001). Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* **16**, 417-22.
- Gosden, R. G. (1990). Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles. *Hum Reprod* **5**, 499-504.
- Gosden, R. G., Baird, D. T., Wade, J. C. & Webb, R. (1994). Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* **9**, 597-603.
- Gougeon, A. (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* **1**, 81-7.
- Green, S. H., Smith, A. U. & Zuckerman, S. (1956). The number of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing. *J Endocrinol* **13**, 330-4.
- Guérif, J. L. F. (2005). L'assistance médicale à la procréation en pratique. Edited by E. Masson.
- H.Lashen. (2007). AMH in pre-pubertal years: a potential marker for future ovarian reserve.
- Hamre, M. R., Robison, L. L., Nesbit, M. E., Sather, H. N., Meadows, A. T., Ortega, J. A., D'Angio, G. J. & Hammond, G. D. (1987). Effects of radiation on ovarian function in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* **5**, 1759-65.
- Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N. & Kurinczuk, J. J. (2005). Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod* **20**, 328-38.
- Hazout, A. (2005). [FSH is a limiting factor]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **34**, 5S24-5S26.
- Hazout, A. (2006). [Quality of ovarian reserve: inhibin B on day 3 of the cycle or antimullerian hormone (AMH)?]. *Gynecol Obstet Fertil* **34**, 1001-2.
- Hendriks, D. J., Mol, B. W., Bancsi, L. F., Te Velde, E. R. & Broekmans, F. J. (2005). Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* **83**, 291-301.
- Hovatta, O. (2000). Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* **169**, 95-7.
- Hovatta, O. (2003). Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **17**, 331-42.
- Hovatta, O., Silye, R., Abir, R., Krausz, T. & Winston, R. M. (1997). Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod* **12**, 1032-6.
- Husseinzadeh, N., Nahhas, W. A., Velkley, D. E., Whitney, C. W. & Mortel, R. (1984). The preservation of ovarian function in young women undergoing pelvic radiation therapy. *Gynecol Oncol* **18**, 373-9.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Rahimi, G. & Nawroth, F. (2003). Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **108**, 186-93.
- Jarrell, J. F., McMahan, A., Barr, R. D. & YoungLai, E. V. (1991). The agonist (d-leu-6,des-gly-10)-LHRH-ethylamide does not protect the fecundity of rats exposed to high dose unilateral ovarian irradiation. *Reprod Toxicol* **5**, 385-8.

- Jeremias, E., Bedaiwy, M. A., Gurunluoglu, R., Biscotti, C. V., Siemionow, M. & Falcone, T. (2002). Heterotopic autotransplantation of the ovary with microvascular anastomosis: a novel surgical technique. *Fertil Steril* **77**, 1278-82.
- Kattera, S., Shrivastav, P. & Craft, I. (1999). Comparison of pregnancy outcome of pronuclear- and multicellular-stage frozen-thawed embryo transfers. *J Assist Reprod Genet* **16**, 358-62.
- Kim, S. S. (2006). Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil Steril* **85**, 1-11.
- Kim, S. S., Battaglia, D. E. & Soules, M. R. (2001). The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril* **75**, 1049-56.
- Kim, S. S., Hwang, I. T. & Lee, H. C. (2004). Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function. *Fertil Steril* **82**, 930-2.
- Kim, S. S., Soules, M. R. & Battaglia, D. E. (2002). Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertil Steril* **78**, 77-82.
- Kinney, A., Kline, J., Kelly, A., Reuss, M. L. & Levin, B. (2007). Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Hum Reprod* **22**, 1175-85.
- Koyama, H., Wada, T., Nishizawa, Y., Iwanaga, T. & Aoki, Y. (1977). Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer* **39**, 1403-9.
- Kurokawa, T., Kinoshita, T., Ito, T., Saito, H. & Hotta, T. (1996). Detection of minimal residual disease B cell lymphoma by a PCR-mediated RNase protection assay. *Leukemia* **10**, 1222-31.
- Larsen, E. C., Loft, A., Holm, K., Muller, J., Brocks, V. & Andersen, A. N. (2000). Oocyte donation in women cured of cancer with bone marrow transplantation including total body irradiation in adolescence. *Hum Reprod* **15**, 1505-8.
- Larsen, E. C., Muller, J., Rechnitzer, C., Schmiegelow, K. & Andersen, A. N. (2003a). Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l. *Hum Reprod* **18**, 417-22.
- Larsen, E. C., Muller, J., Schmiegelow, K., Rechnitzer, C. & Andersen, A. N. (2003b). Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5307-14.
- Lee, M. M., Donahoe, P. K., Hasegawa, T., Silverman, B., Crist, G. B., Best, S., Hasegawa, Y., Noto, R. A., Schoenfeld, D. & MacLaughlin, D. T. (1996). Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 571-6.
- Letur-Konirsch, H., Lefaix, J. L. & Delanian, S. (2005). [Uterus after irradiation]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 605-9.
- Levy, R. (2005). [Apoptosis in oocyte]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 645-52.
- Li, F. P., Gimbrere, K., Gelber, R. D., Sallan, S. E., Flamant, F., Green, D. M., Heyn, R. M. & Meadows, A. T. (1987). Outcome of pregnancy in survivors of Wilms' tumor. *Jama* **257**, 216-9.
- Licciardi, F. L., Liu, H. C. & Rosenwaks, Z. (1995). Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* **64**, 991-4.

- Lornage, J., Courbiere, B., Mazoyer, C., Odagescu, V., Baudot, A., Bordes, A., Poirel, M. T., Franck, M. & Salle, B. (2006). [Ovarian tissue vitrification: Cortex and whole ovary in sheep]. *Gynecol Obstet Fertil* **34**, 746-53.
- Lucci, C. M., Kacinskis, M. A., Lopes, L. H., Rumpf, R. & Bao, S. N. (2004). Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* **61**, 1101-14.
- Lushbaugh, C. C. & Casarett, G. W. (1976). The effects of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: a review. *Cancer* **37**, 1111-25.
- Maher, E. R. (2005). Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**, R133-8.
- Maher, E. R., Afnan, M. & Barratt, C. L. (2003). Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum Reprod* **18**, 2508-11.
- Marchesoni, D., Driul, L., Fruscalzo, A., Santuz, M., Calcagno, A., Ianni, A., Geromin, A. & Fanin, R. (2005). [Premature ovarian failure in patients affected by oncohematological disease]. *Minerva Ginecol* **57**, 545-50.
- Marmor, D. (1999). [Fertility in women after cancer therapy]. *Contracept Fertil Sex* **27**, 417-22.
- Martinez-Madrid, B., Dolmans, M. M., Van Langendonck, A., Defrere, S. & Donnez, J. (2004). Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril* **82**, 1390-4.
- Mastro, L. D., Catzeddu, T. & Venturini, M. (2006). Infertility and pregnancy after breast cancer: Current knowledge and future perspectives. *Cancer Treat Rev*.
- Meirow, D. (2000). Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol* **169**, 123-31.
- Meirow, D., Assad, G., Dor, J. & Rabinovici, J. (2004). The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. *Hum Reprod* **19**, 1294-9.
- Meirow, D., Dor, J., Kaufman, B., Shrim, A., Rabinovici, J., Schiff, E., Raanani, H., Levron, J. & Fridman, E. (2007). Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod*.
- Meirow, D., Levron, J., Eldar-Geva, T., Hardan, I., Fridman, E., Zalel, Y., Schiff, E. & Dor, J. (2005). Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* **353**, 318-21.
- Meirow, D., Lewis, H., Nugent, D. & Epstein, M. (1999). Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod* **14**, 1903-7.
- Meirow, D. & Nugent, D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* **7**, 535-43.
- Migishima, F., Suzuki-Migishima, R., Song, S. Y., Kuramochi, T., Azuma, S., Nishijima, M. & Yokoyama, M. (2003). Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* **68**, 881-7.
- Monniaux, D. (2002). [Oocyte apoptosis and evolution of ovarian reserve]. *Gynecol Obstet Fertil* **30**, 822-6.
- Morice, P., Juncker, L., Rey, A., El-Hassan, J., Haie-Meder, C. & Castaigne, D. (2000). Ovarian transposition for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril* **74**, 743-8.
- Morita, Y., Perez, G. I., Paris, F., Miranda, S. R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J. C., Schuchman, E. H., Kolesnick, R. N. & Tilly, J. L.

- (2000). Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* **6**, 1109-14.
- Neto, V., Guerin, P., Lornage, J., Corrao, N., Buff, S. & Joly, T. (2005). [Follicular morphology after ovarian cortex cryopreservation in the rabbit doe (*Oryctolagus cuniculus*)]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 793-8.
- Newton, H., Aubard, Y., Rutherford, A., Sharma, V. & Gosden, R. (1996). Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* **11**, 1487-91.
- Newton, H., Fisher, J., Arnold, J. R., Pegg, D. E., Faddy, M. J. & Gosden, R. G. (1998). Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* **13**, 376-80.
- Oktaç, K. (2001). Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update* **7**, 526-34.
- Oktaç, K., Buyuk, E., Rosenwaks, Z. & Rucinski, J. (2003). A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertil Steril* **80**, 193-8.
- Oktaç, K., Buyuk, E., Veeck, L., Zaninovic, N., Xu, K., Takeuchi, T., Opsahl, M. & Rosenwaks, Z. (2004). Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* **363**, 837-40.
- Oktaç, K. & Karlikaya, G. (2000). Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* **342**, 1919.
- Oktaç, K., Newton, H., Mullan, J. & Gosden, R. G. (1998). Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* **13**, 1133-8.
- Olivennes, F. (2005). Do children born after assisted reproductive technology have a higher incidence of birth defects? *Fertil Steril* **84**, 1325-6; discussion 1327.
- Olivennes, F. & Aubard, Y. (2002). [Treatment of cancer in women and fertility preservation]. *Bull Cancer* **89**, 786-94.
- Penarrubia, J., Balasch, J., Fabregues, F., Carmona, F., Casamitjana, R., Moreno, V., Calafell, J. M. & Vanrell, J. A. (2000). Day 5 inhibin B serum concentrations as predictors of assisted reproductive technology outcome in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod* **15**, 1499-504.
- Perez, G. I., Knudson, C. M., Leykin, L., Korsmeyer, S. J. & Tilly, J. L. (1997). Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med* **3**, 1228-32.
- Poirot, C., Brugieres, L., Genestie, C. & Martelli, H. (2005). [Ovarian tissue cryopreservation for prepubertal girls: indications and feasibility]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 799-803.
- Poirot, C., Martelli, H., Lichtblau, I., Dhedin, N., Abirached, F., Faraguet, C. & Vacher-Lavenu, M. C. (2002). [Female fertility preservation before sterilizing treatment: contribution of ovarian tissue cryopreservation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **31**, 717-23.
- Radford, J. A., Lieberman, B. A., Brison, D. R., Smith, A. R., Critchlow, J. D., Russell, S. A., Watson, A. J., Clayton, J. A., Harris, M., Gosden, R. G. & Shalet, S. M. (2001). Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* **357**, 1172-5.
- Revel, A. & Laufer, N. (2002). Protecting female fertility from cancer therapy. *Mol Cell Endocrinol* **187**, 83-91.

- Rosenblum, O. & Rampenau, C. (2005). [Psychological approach of young girls in situation of ovarian tissue cryopreservation treated by chemotherapy toxic for gonads]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**, 809-12.
- Rosendahl, M., Loft, A., Byskov, A. G., Ziebe, S., Schmidt, K. T., Andersen, A. N., Ottosen, C. & Andersen, C. Y. (2006). Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod* **21**, 2006-9.
- Rosendahl M., L. A., Freiesleben N.L.C., Lossl K. (2007). Ovarian follicular dynamics during gonadotoxic chemotherapy.
- Salehnia, M., Abbasian Moghadam, E. & Rezazadeh Velojerdi, M. (2002). Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* **78**, 644-5.
- Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Rudigoz, R. C., Guerin, J. F. & Lornage, J. (2002). Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* **77**, 403-8.
- Sanchez M., R.-S. E., Teruel J., Lizan C., Tamarit G., Pellicer A. (2007). Incidence of micrometastases in women with breast cancer requesting ovarian cryopreservation to preserve fertility.
- Schuck, A., Hamelmann, V., Bramswig, J. H., Konemann, S., Rube, C., Hesselmann, S., Riesenbeck, D., Horst, E., Bolling, T., Paulussen, M., Jurgens, H. & Willich, N. (2005). Ovarian function following pelvic irradiation in prepubertal and pubertal girls and young adult women. *Strahlenther Onkol* **181**, 534-9.
- Scott, R. T., Toner, J. P., Muasher, S. J., Oehninger, S., Robinson, S. & Rosenwaks, Z. (1989). Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* **51**, 651-4.
- Seifer, D. B., Lambert-Messerlian, G., Hogan, J. W., Gardiner, A. C., Blazar, A. S. & Berk, C. A. (1997). Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* **67**, 110-4.
- Seifer, D. B., MacLaughlin, D. T., Christian, B. P., Feng, B. & Shelden, R. M. (2002). Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* **77**, 468-71.
- Senn, A., Vozzi, C., Chanson, A., De Grandi, P. & Germond, M. (2000). Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. *Fertil Steril* **74**, 946-52.
- Sepaniak, S., Forges, T. & Monnier-Barbarino, P. (2006). [Cigarette smoking and fertility in women and men]. *Gynecol Obstet Fertil* **34**, 945-9.
- Shaw, J. M., Bowles, J., Koopman, P., Wood, E. C. & Trounson, A. O. (1996). Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* **11**, 1668-73.
- Shaw, J. M., Oranratnachai, A. & Trounson, A. O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* **53**, 59-72.
- Sugimoto, M., Maeda, S., Manabe, N. & Miyamoto, H. (2000). Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* **53**, 1093-103.
- Sutcliffe, A. G., Peters, C. J., Bowdin, S., Temple, K., Reardon, W., Wilson, L., Clayton-Smith, J., Brueton, L. A., Bannister, W. & Maher, E. R. (2006). Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey. *Hum Reprod* **21**, 1009-11.

- Themmen, A. P. (2005). Anti-Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 18-21.
- Thibaud, E., Ramirez, M., Brauner, R., Flamant, F., Zucker, J. M., Fekete, C. & Rappaport, R. (1992). Preservation of ovarian function by ovarian transposition performed before pelvic irradiation during childhood. *J Pediatr* **121**, 880-4.
- Thibaud, E., Rodriguez-Macias, K., Trivin, C., Esperou, H., Michon, J. & Brauner, R. (1998). Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood. *Bone Marrow Transplant* **21**, 287-90.
- Tomas, C., Nuojua-Huttunen, S. & Martikainen, H. (1997). Pretreatment transvaginal ultrasound examination predicts ovarian responsiveness to gonadotrophins in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* **12**, 220-3.
- Torgerson, D. J., Avenell, A., Russell, I. T. & Reid, D. M. (1994). Factors associated with onset of menopause in women aged 45-49. *Maturitas* **19**, 83-92.
- Tryde Schmidt, K. L., Yding Andersen, C., Starup, J., Loft, A., Byskov, A. G. & Nyboe Andersen, A. (2004). Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online* **8**, 448-53.
- van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., te Velde, E. R., Fauser, B. C., Bancsi, L. F., de Jong, F. H. & Themmen, A. P. (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* **17**, 3065-71.
- Visser, J. (2006). [Role of anti-Mullerian hormone in follicle recruitment and maturation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **35**, 2S30-2S34.
- Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S. & Themmen, A. P. (2006). Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* **131**, 1-9.
- Whitehead, E., Shalet, S. M., Blackledge, G., Todd, I., Crowther, D. & Beardwell, C. G. (1983). The effect of combination chemotherapy on ovarian function in women treated for Hodgkin's disease. *Cancer* **52**, 988-93.
- Williams, R. S., Littell, R. D. & Mendenhall, N. P. (1999). Laparoscopic oophorectomy and ovarian function in the treatment of Hodgkin disease. *Cancer* **86**, 2138-42.
- Yin, H., Wang, X., Kim, S. S., Chen, H., Tan, S. L. & Gosden, R. G. (2003). Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* **18**, 1165-72.
- Yoon, T. K., Kim, T. J., Park, S. E., Hong, S. W., Ko, J. J., Chung, H. M. & Cha, K. Y. (2003). Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* **79**, 1323-6.
- Zuckerman, T. (2007). Spontaneous pregnancy and normal delivery after repeated autologous bone marrow transplantation and GnRH agonist treatment. *Hum Reprod* **22**, 2346.

NOM : LOOSVELD Marie

Titre de Thèse : Congélation du cortex ovarien en vue de la préservation de la fertilité chez la petite fille et la jeune femme :
Etat des lieux, revue de la littérature, bilan de l'expérience au CHU de Nantes

RESUME

Les récents progrès des traitements anti-cancéreux ont permis l'amélioration de la survie des patientes. Chez ces patientes survivantes de cancer, se pose désormais le problème de la qualité de vie après la maladie. Or, ces traitements anti-cancéreux sont souvent responsables d'une insuffisance ovarienne précoce.

La cryopréservation du tissu ovarien est une voie de recherche pour restaurer la fertilité des patientes après guérison. L'annonce récente de deux naissances dans l'espèce humaine suite à une cryopréservation et greffe ovarienne a été porteuse de beaucoup d'espoir.

Notre étude s'est intéressée aux cas d'autoconservations de tissu ovarien réalisés dans le service de médecine et de biologie de la reproduction du CHU de Nantes entre 1995 et 2007 afin d'évaluer si la cryopréservation ovarienne était réalisée au meilleur moment.

D'après nos résultats, nous pensons qu'il serait préférable de réaliser le prélèvement de tissu ovarien avant la mise en place du traitement par chimiothérapie, cela bien sûr dans les limites possibles de l'urgence thérapeutique.

MOTS-CLES

CRYOPRESERVATION OVARIENNE

FERTILITE

CHIMIOTHERAPIE