



HAL
open science

Cryoconservation ovarienne : Étude de la folliculogénèse in vitro chez l'ovine et chez l'humain

Lionel Maurice Edouard Mery

► To cite this version:

Lionel Maurice Edouard Mery. Cryoconservation ovarienne : Étude de la folliculogénèse in vitro chez l'ovine et chez l'humain. Biologie de la reproduction. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT: . tel-00373171

HAL Id: tel-00373171

<https://theses.hal.science/tel-00373171>

Submitted on 3 Apr 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 27 novembre 2008

par

Lionel MERY

Cryoconservation ovarienne. Etude de la folliculogenèse in vitro chez l'ovin et chez l'humain.

Directeurs de thèse :

Professeur Jean François GUERIN

Docteur Jacqueline LORNAGE

JURY :

Professeur Bruno SALLE, Président

Docteur Jacqueline MANDELBAUM, Rapporteur

Professeur Johan SMITZ, Rapporteur

Professeur Jean François GUERIN

Docteur Jacqueline LORNAGE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX
M. le Professeur J. LIETO
M. le Professeur D. SIMON
M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT
Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
Directeur : M. O. ROBIN
Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Electrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
UFR de Mathématiques
UFR d'Informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR STAPS
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon
IUT A
IUT B
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK
Directeur : M. le Professeur H. PINON
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur G. CLERC
Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
Directeur : M. C. COLLIGNON
Directeur : M. le Professeur R. BACON
Directeur : M. le Professeur J. LIETO
Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Bruno SALLE,

Tout au long de notre passage au sein de l'unité, vous nous avez permis de comprendre qu'une structure de Médecine de la Reproduction devait s'articuler autour d'une coopération étroite entre la partie clinique et biologique.

Nous vous remercions de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury et recevez à travers ce travail notre plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Jean François GUERIN,

Depuis la première année de Médecine et jusqu'à ce jour, grâce à votre pédagogie, vous nous avez transmis le goût de la spécialité de Biologie de la Reproduction. Vous nous avez également permis de bénéficier de vos conseils avisés au cours de ces années passées dans votre service.

Veillez trouver dans ce travail toute notre reconnaissance et l'expression de notre plus profond respect.

A Madame le Docteur Jacqueline LORNAGE,

Nous vous remercions de nous avoir initié à la Biologie de la Reproduction et de nous avoir transmis votre expérience au long de ces 6 années passées à vos côtés. Nous vous remercions d'avoir encadré ce travail avec une rigueur et une disponibilité remarquable malgré les nombreuses préoccupations de ces deux dernières années (certification, déménagement...).

Nous vous témoignons à travers ce travail une immense gratitude et notre plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Johan SMITZ,

Nous vous remercions d'avoir accepté d'être rapporteur pour notre thèse et de tout ce que vous nous avez apporté grâce à vos travaux sur la folliculogenèse in vitro.

A travers cette thèse, nous vous témoignons notre immense gratitude.

A Madame le Docteur Jacqueline MANDELBAUM,

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger cette thèse traduisant l'intérêt que vous portez à ce travail.

Recevez ici le témoignage de notre plus grand respect.

A tout le personnel médical et paramédical du service de Médecine de la Reproduction de l'hôpital Edouard Herriot.

Merci pour toutes ces années à vos côtés...

A tout le personnel du laboratoire d'anatomo-pathologie de l'hôpital Edouard Herriot, du centre commun de quantimétrie, et des abattoirs de Corbas, ...

A toute l'équipe de l'ex unité INSERM 418, le Dr Annick LEFEVRE, Nada, Samira, Thierry BLACHERE et Rita KHOUEIRY pour leur coopération fructueuse.

A toute l'équipe du laboratoire de Recherche de la Faculté. Un merci à toutes les personnes qui m'ont accompagné lors de ce travail: Dr Mehdi BENCHAIIB, Céline BERTHILLOT, Odile ANCHER, Ghaya MERDASSI et (la remplaçante idéale de Claire) Audrey PIERROT. Merci à Jacqueline FUGIER pour son aide et sa bonne humeur réconfortante.

A Banu DEMIRCI,

Qui a mis au point toutes les techniques de culture *in vitro* au sein du département et qui a permis la réalisation de ce travail.

A la seule et formidable Claire MAZOYER...un immense merci pour tout ce que tu as fait pour moi...

A tous les Biologistes de Synerbio-Progrès: Charles, Françoise, Georges, Martine, Nathalie, Patrick, Philippe, Pierre, Sophie et à tout le personnel de Synerbio-Pogrès.

Merci de votre accueil et de votre confiance.

A mes éventuelles ex-futures collaboratrices, les 2 Anne et Stéphanie

A mes anciens voisins lyonnais et à mes nouveaux voisins stéphanois

A mes parents...

A mes frère et sœurs...

A mes neveux et nièces...

A mes cousins et à ma tante,

A mes parrain et marraine,

A ma belle famille,

Merci de votre présence.

A mes amis : Alexandre, Anne-Sophie, Antoine, Arnaud, Bérangère, les 2 Bertrand, Carine, Carole, Caroline, Cédric, Charles, Claire, Didier, Djassia, Elie, Eric, Emmanuelle, Franck, François, Fred, Hervé, Hugo, JB, Jérôme, Isabelle, Laure, Ludo, Maria, Marie, Mathieu, Nico, Pierre, Philippe, Sandrine, Renaud, Seb, Serkan, Sophie, Stéphane, Stéphanie, Yannick, Yanick ...

Merci pour tous ces moments partagés.

A ma famille de France et d'Algérie.

A tous les autres.

A Milo et Stella, Iota, Mella et Girouette.

A Lise, la femme de ma vie...

A Lou la deuxième « petite femme » de ma vie

A Julien le « petit homme » de ma vie

A la future troisième « petite femme » de ma vie...

RESUME

La culture de cortex ovarien se pose comme une alternative à l'autogreffe après autoconservation ovarienne. Pour améliorer la survie folliculaire après congélation, nous avons évalué chez la brebis l'influence de l'épaisseur de cortex ; 0,5 vs 1mm, du support de culture et du cryoprotecteur DMSO 2M vs PROH 1,5M+sucrose 0,3M. L'épaisseur de tissu de 1mm sur filtre millicell avec le protocole de congélation DMSO 2M a montré les meilleurs résultats avec 39% de survie folliculaire au 4e jour de culture. Sur tissu frais de brebis et humain, nous avons exploré un éventuel déficit d'expression en culture de Gdf9, de Bmp15 et de leur récepteurs qui expliquerait le blocage de croissance folliculaire *in vitro*. Dans les deux modèles la présence des ARNm et des protéines de Gdf9 et Bmp15 est maintenue et l'expression protéique de leurs récepteurs BmprIA, BmprIB, BmprII est conservée. Ce travail montre que la survie en culture après cryoconservation peut être optimisée, la cause du blocage de croissance reste à définir.

TITLE

Ovarian cryopreservation. Human and ovine *in vitro* folliculogenesis.

ABSTRACT

Culture of ovarian cortex can be an alternative to autograft after ovarian cryopreservation. To improve follicular survival after freezing we evaluated the influence of the sheep cortex width; 0.5 vs 1mm, of the culture support and the cryoprotector DMSO 2M vs PROH 1.5M + sucrose 0.3M. The 1mm tissue width on millicell filter with the DMSO 2M freezing protocol displayed better results with 39% follicular survival on the 4th day of culture. On human and sheep fresh tissue, we explored a potential expression deficit in culture of Gdf9, Bmp15 and their receptors; this would explain the blocking of follicular growth *in vitro*. In both cases the level of ARNm and proteins Gdf9 and Bmp15 is maintained and so is the protein formula of their BmprIA, BmprIB, BmprII receptors. This study shows how survival in culture after cryopreservation can be optimised, the reason of the growth blocking remains to be determined

DISCIPLINE : Biologie de la Reproduction

MOTS-CLES

Ovaire, croissance folliculaire, *in vitro*, humain, brebis.

Ovary, follicular growth, *in vitro*, human, sheep.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire Biologie de la Reproduction et du Développement. 8 av Rockefeller 69008 Lyon

LISTE DE TITRES ET TRAVAUX CONCERNANT LE TRAVAIL DE THESE

- **Communications sur panneaux (posters):**

Mery L, Lefevre A, Benchaïb M, Demerci B, Salle B, Guérin JF, Lornage J.
Follicular growth *in vitro*: role of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) / Bone Morphogenic Protein 15 (BMP15) in growth arrest in sheep
European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Prague, 2006

Mery L, Demerci B, Salle B, Benchaïb M, Guérin JF, Lornage J.
In vitro culture of ovarian cortical slices after slow cooling in sheep.
European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Copenhagen, 2004.

- **Communications orales**

Mery L, Demerci B, Mazoyer C, Salle B, Benchaïb M, Guérin JF, Lornage J.
Folliculogénèse *in vitro*: rôle du couple Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) / Bone Morphogenic Protein 15 (BMP15) dans le blocage de la croissance folliculaire.
Fédération Française d'Etude de La Reproduction (FFER), Deauville, 2005.

Mery L, Lefevre A, Benchaïb M, Demerci B, Salle B, Guérin JF, Lornage J.
Folliculogénèse *in vitro*: détection du couple Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) / Bone Morphogenic Protein 15 (BMP15) et leurs récepteurs en culture *in vitro*. Fédération des CECOS, Dijon, 2007.
1^{er} Prix article de recherche 2006

- **Publications**

Mery L, Lefevre A, Benchaïb M, Demerci B, Salle B, Guérin JF, Lornage J.
Follicular growth *in vitro*: Detection of Growth differentiation Factor 9 (GDF9) / Bone Morphogenic Protein 15 (BMP15) during *in vitro* culture of ovine cortical slices.
Molecular Reproduction and Development. 2006 Dec 8;74(6):767-774

Rita Khoueiry, Samira Ibalá-Rhomdane, **Lionel Mery**, Thierry Blachère, Jean-François Guérin, Jacqueline Lornage, Annick Lefèvre.
Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes.
J Med Genet 2008/057943

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Liste de titres et travaux concernant le travail de thèse.....	8
Table des matières	9
Abréviations	12
Introduction	14
Rappels bibliographiques	18
I. Physiologie de la reproduction comparée femme/brebis	18
A. <i>Les similitudes</i> :.....	18
B. <i>Les différences</i> :	28
II. Folliculogenèse : croissance basale.....	31
III. Principe de cryobiologie.....	36
A. <i>Composition du milieu extracellulaire</i>	38
B. <i>Utilisation de cryoprotecteurs</i>	38
C. <i>Vitesse de congélation</i>	42
D. <i>Vitesse de décongélation après congélation lente</i>	48
E. <i>Congélation du tissu</i>	48
IV. Intérêts et indications de l'autoconservation ovarienne en médecine humaine	49
A. <i>Action des traitements anticancéreux sur la fonction gonadique</i>	50
B. <i>Radiothérapie</i>	51
C. <i>Chimiothérapie</i>	53
V. Cinq différentes stratégies pour préserver la fonction gonadique.....	61
A. <i>Au cours de la Radiothérapie</i>	61
B. <i>Au cours de la Chimiothérapie</i>	61
C. <i>Au cours de radio et/ou chimiothérapie</i>	62
D. <i>Congélation d'embryons et/ou d'ovocytes mûrs</i>	63
E. <i>Congélation ovarienne</i>	64
F. <i>Avenir</i>	68
VI. Folliculogénèse <i>in vitro</i>	69
A. <i>Travaux à partir du tissu ovarien frais</i>	70
B. <i>Travaux à partir du tissu ovarien congelé / décongelé</i>	74
C. <i>Conditions de cultures</i>	81
D. <i>Maturation in vitro</i>	84
Etudes expérimentales chez la brebis	85

Matériels et Méthodes	87
I. Préparation du tissu ovarien	87
A. <i>Prélèvement à l'abattoir</i>	87
B. <i>Préparation au laboratoire</i>	87
II. Culture in vitro : tissu ovarien frais.....	88
A. <i>Mise en culture</i>	88
B. <i>Etude histologique</i>	93
C. <i>Etude de l'expression de GDF9/BMP15 par la technique de RT-PCR</i>	94
D. <i>Immunolocalisation de GDF9/BMP15</i>	99
III. Culture in vitro tissu ovarien congelé / décongelé	102
A. <i>Préparation du tissu ovarien</i>	102
B. <i>Préparation du milieu de congélation</i>	102
C. <i>Protocoles de congélation</i>	102
D. <i>Mise en culture</i>	104
E. <i>Analyse histologique</i>	104
IV. Etude statistique	105
V. Récapitulatifs des différentes séries	106
Résultats	107
I. Culture in vitro : tissu ovarien frais.....	107
A. <i>Etude de l'expression de GDF9/BMP15</i>	107
B. <i>Étude de l'influence de l'épaisseur du cortex sur la culture</i>	113
C. <i>Étude de l'influence du support sur la culture</i>	118
II. Culture in vitro : tissu ovarien congelé/décongelé	121
A. <i>Influence de l'épaisseur du tissu congelé/décongelé</i>	121
B. <i>Influence de la nature des cryoprotecteurs</i>	124
Etudes expérimentales chez l'humain	129
Matériels et méthodes.....	130
I. Origine des ovaires	130
<i>Au préalable de cette étude, le comité local éthique et les femmes ont donné leur accord pour l'utilisation des produits humains.</i>	130
A. <i>Ovaires de fœtus</i>	130
B. <i>Ovaires adultes</i>	130
II. Préparation des ovaires.....	131
A. <i>Ovaires de Fœtus</i>	131
B. <i>Ovaires adultes</i>	131
III. Technique de culture	131
IV. Etude histologique	132
V. Immunomarquage de GDF9, BMP15, BMPRII, BMPRII et TGFβR1	133
Résultats	135
I. Ovaires de Fœtus	135

A. <i>Etude morphologique</i>	135
B. <i>Immunolocalisation de GDF9 et BMP15 et leurs récepteurs</i>	138
II. Ovaires adultes	139
A. <i>Etude morphologique</i>	140
B. <i>Immunolocalisation de GDF9 et BMP15 et leurs récepteurs</i>	143
C. <i>Étude morphométrique</i>	145
Discussion	149
Conclusions et Perspectives	166
Références bibliographiques	168
Annexes	184

ABREVIATIONS

°C : degré Celsius
Ac : anticorps
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ALK : activin like kinase
 α -MEM : α -minimum essential medium
AMH : antimüllerian hormone
AMP : assistance médicale à la procréation
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATA : atmosphère
bFGF : basic fibroblast growth factor
BMP4 : bone morphogenic protein 4
BMP7 : bone morphogenetic protein 7
BMP15 : bone morphogenetic protein 15
BSA : bovine serum albumin
CG : cellules de la granulosa
COCs : : cumulus oocyte complex
CO₂ : dioxyde de carbone
DAB : 3,3'-diaminobenzidine
DMEM : dulbecco's modified eagle's medium
DMSO : diméthylsulfoxyde
EG : éthylène glycol
EGF : epidermal growth factor
FIV : fécondation in vitro
FSH : follicle stimulating hormone
GDF9 : growth differentiation factor 9
GH : growth hormone
GnRH : gonadotrophin releasing hormone
Gy : Gray
H₂O : eau
HCG : human chorionic gonadotrophin
HPS : hematoxyline-phloxine B-safran
HSA : human serum albumin
Ig : immunoglobuline
IGF-I : insuline growth factor i
ICSI : injection de spermatozoïde intra cytoplasmique
ICT : irradiation corporelle totale
ITS : insuline-transferrine-sélénium
J : jour
KGF : keratinocyte growth factor
KL : Kit Ligand
L : litre
LA : leucémie aigue

LAL : leucémie aigue lymphoïde
LAM : leucémie aigue myéloïde
LED : lupus erythémateux disséminés
LH : luteinizing hormone
LIF : leukemia inhibiting factor
LMC : leucémie myéloïde chronique
LMH : lymphome malin hodgkinien
LMNH : lymphome malin non hodgkinien
M : molaire
MII : métaphase de 2ième division de méiose
µg : microgramme
µl : microlitre
µm : micromètre
min : minute
mg : milligramme
ml : millilitre
mm : millimètre
mm² : millimètre carré
N₂ : azote
ng : nanogramme
nmol : nanomolaire
NO : nitric oxyde
O₂ : oxygène
OR : odds ratio
PBS : phosphate buffered solution (solution phosphate tamponnée)
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PCOS : syndrome des ovaires polykystiques
PCR : polymerase chain reaction
PR : polyarthrites rhumatoïdes
PROH : propanediol ou propylene glycol
RT : reverse transcription
pRb : protéine de retinoblastome
S1P : sphingosine 1 phosphate
SCF : stem cell factor
SCID : severe combined immunodeficiency
Sec : seconde
SEM : écart type des moyennes
SVF : sérum de veau foetal
TGFβ : transforming growth factor β
UI : unité internationnal
VEGF : vascular endothelial growth factor
WT1 : tumeur de Williams
ZP : zone pellucide

INTRODUCTION

L'existence de banques de tissu ovarien en médecine humaine représente un véritable espoir pour toutes les femmes et jeunes filles devant subir un traitement anticancéreux. Contrairement aux spermatozoïdes qui peuvent être facilement conservés (recueil facile, contingent important et renouvelable, cellules de faible volume résistantes à la congélation, cellules matures), les ovocytes possèdent de nombreux inconvénients :

- L'ovocyte n'est pas isolé pendant sa croissance, il est lié à un groupe cellulaire, les cellules folliculeuses, l'ensemble constitue le follicule ovarien. L'ovocyte peut donc être conservé « dénudé » isolé du groupe cellulaire (Porcu and Venturoli 2006), cette solution concerne des follicules en croissance déjà avancée. Pour les follicules de réserves, il est envisageable d'utiliser le follicule ovarien entier isolé du cortex (Amorim et al. 2007) ou le tissu ovarien entier (Gosden et al. 1994). Cette dernière alternative est intéressante car elle permet de conserver l'intégrité des liaisons cellulaires, permettant la transmission des signaux autocrines et paracrines nécessaires aux premières étapes de la folliculogénèse (Parrott 1960).
- L'ovocyte peut être congelé à différents stades de croissance. Au stade d'ovocyte mûr (bloqué en métaphase II) (Porcu et al. 2000) ou au stade vésicule germinative (quelques heures de maturation in vitro sont nécessaires) (Oktay et al. 1998), le gamète est en théorie apte à être fécondé après décongélation. Mais différents problèmes se posent alors, on se retrouve devant un faible contingent d'ovocytes mûrs (aucun chez la petite fille) et les ovocytes étant de grande taille, ils sont peu résistants à la congélation (George et al. 1996).

La congélation d'ovocytes immatures au sein des follicules de réserve permet de contourner ces problèmes : on se retrouve devant un contingent folliculaire important (technique utilisable chez la jeune fille) et l'ovocyte de petite taille est résistant à la congélation. Cependant une longue étape de maturation *in vivo* (greffe) ou *in vitro* est alors nécessaire pour parvenir au stade de follicule préovulatoire.

Les premiers travaux sur la congélation du tissu ovarien remontent aux années 50 : des reprises de greffes étaient obtenues chez la souris et le rat, après congélation à -79°C (dioxyde de carbone solide) en utilisant le glycérol comme cryoprotecteur (Parkes and Smith 1953; Deanesly 1954) . La première grossesse a été obtenue chez la souris en 1960 (Parrott 1960). Des années 60 jusqu'aux années 90, très peu de travaux sur la congélation d'ovaire ont été publiés. A partir des années 90, différentes voies de recherches ont été explorées : Gosden et al. ont réalisé la congélation et l'autogreffe du tissu ovarien chez la brebis en obtenant une gestation (Gosden et al. 1994). Dans notre équipe des naissances après autogreffe chez la brebis sont effectives depuis 2002 (Salle *et al.* 2002; Salle *et al.* 2003). Chez la femme des grossesses ont été rapportées récemment par autogreffe par différentes équipes (Donnez *et al.* 2004; Meiorow *et al.* 2005; Meiorow *et al.* 2007; Andersen *et al.* 2008).

Les autres voies de développement comme la xénogreffe de tissu ovarien féminin sur des souris immunodéficientes (SCID, NUDE) donne des résultats encourageants (Gook *et al.* 2001; Maltaris *et al.* 2007; Schubert *et al.* 2008) mais son application pose des problèmes éthiques.

La culture *in vitro* est une alternative intéressante car elle élimine le risque de transmission de cellules cancéreuses par le greffon (Shaw et al. 1996) et supprime aussi le risque de transformation néoplasique du tissu ovarien greffé (Mueller et al. 2005).

Les études réalisées sur des cultures après congélation/décongélation de tissu ovarien humain ont montré des survies intéressantes que ce soit chez l'adulte (Hovatta et al. 1997; Isachenko et al. 2003; Schmidt et al. 2005), ou le fœtus (Sadeu et al. 2006).

Concernant la folliculogénèse *in vitro* de tissu frais, l'initiation de la croissance folliculaire a été obtenue chez la souris dès 1965 (Blandau et al. 1965). Eppig and O'Brien ont réalisé une folliculogénèse *in vitro* complète avec plusieurs naissances de souriceaux (Eppig and O'Brien 1996; O'Brien et al. 2003). Chez les grands mammifères (bovin, ovin, humain) la culture *in vitro* a permis une entrée en croissance des follicules primordiaux, mais un arrêt précoce de croissance est observé dès le stade follicule primaire ou secondaire précoce (Wandji *et al.* 1996; Cecconi *et al.* 1999; Hovatta *et al.* 1999).

Les mécanismes qui régissent la folliculogénèse *in vivo* sont encore méconnus, le couple kit ligand/c-kit serait impliqué dans l'initiation de la croissance (Parrott and Skinner 1999). La sécrétion de kit-ligand serait sous la dépendance de divers facteurs paracrines inhibiteurs ou stimulateurs. Différentes molécules semblent jouer un rôle inhibiteur comme l'hormone anti-müllérienne (AMH) (Durlinger et al. 2002) et la somatostatine (SST) (Goddard et al. 2001). A l'inverse, l'initiation de la croissance folliculaire pourrait s'expliquer par l'augmentation de facteurs locaux stimulateurs comme Epidermal Growth Factor (EGF) (Picton 2001), Bone Morphogenetic protein 7 (BMP7) (Lee et al. 2001), basic fibroblast growth factor (bFGF) (Nilsson et al. 2001), leukemia inhibiting factor (LIF) (Nilsson et al. 2002) ou BMP 4 (Nilsson and Skinner 2003). Concernant les étapes qui suivent l'initiation de la croissance folliculaire, parmi les 40 membres de la super famille des Transforming Growth Factor β (TGF β) (Chang et al. 2002), le Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) et le Bone Morphogenetic Protein 15, (BMP15) semblent essentiels pour le passage des follicules primaires aux follicules secondaires. Plusieurs études étayent ces hypothèses : les souris déficientes (Knock Out) en GDF9 (Dong et al. 1996) et les brebis homozygotes déficientes en GDF9 et BMP15 (Galloway et al. 2000; Hanrahan et al. 2004) sont stériles et leurs follicules sont bloqués au stade primaire. Des résultats identiques ont été retrouvés chez des brebis immunisées contre GDF9 et/ou BMP15 (Juengel et al. 2004). Chez la femme, des insuffisances ovariennes ont été observées avec des mutations sur le gène BMP15 (Di

Pasquale et al. 2004) ou GDF9 (Kovanci et al. 2007) et au cours d'une culture de tissu ovarien, Hreinsson et al., en 2002 ont obtenu un plus grand nombre de follicules secondaires en ajoutant du GDF9 au milieu de culture (Hreinsson et al. 2002).

Au cours de notre étude nous avons donc exploré l'autoconservation ovarienne et en particulier le versant concernant la folliculogenèse in vitro.

Dans un premier temps nous avons étudié sur le modèle ovin la culture après congélation décongélation ; en culture de tissu frais, nous avons exploré le blocage de la croissance folliculaire en recherchant l'expression de facteurs impliqués dans la croissance basale tel que GDF9 ou BMP15. Nous avons dans un deuxième temps appliqué ces méthodes au modèle humain.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Physiologie de la reproduction comparée

femme/brebis

A. Les similitudes :

1. Localisation anatomique et histologie

Pour les deux espèces, l'ovaire est un organe pair en forme de haricot, situé dans la cavité péritonéale. Au niveau histologique, deux zones principales se distinguent : au centre, une zone médullaire constituée d'un tissu conjonctif traversé par les systèmes sanguin et nerveux ; en périphérie, une zone corticale, constituée de tissu conjonctif, de capillaires, de cellules musculaires et de follicules ovariens à différents stades de développement. Le cortex est classiquement décrit comme le tissu fonctionnel de l'ovaire, siège de l'ovogenèse et de la folliculogenèse. La médullaire est décrite comme un tissu de soutien. En surface, l'ovaire est composé d'une couche de cellules épithéliales cuboïdales recouverte d'une tunique albuginée (Figure 1 et Figure 2).

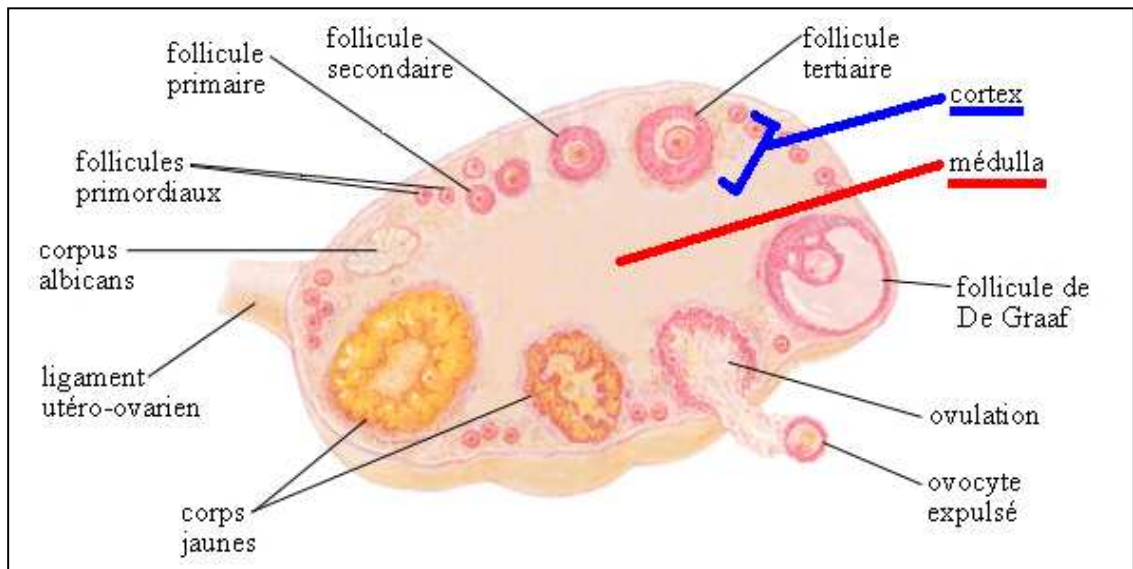


Figure 1 : schéma d'une coupe d'ovaire laissant apparaître la médulla ou zone médullaire et la zone corticale ou cortex. Anonymes

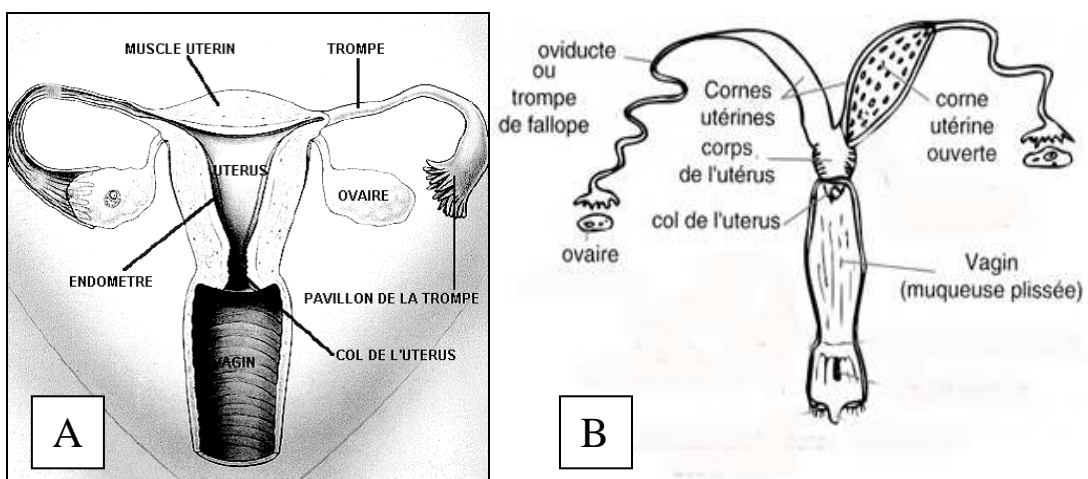


Figure 2 : schéma de coupes frontales d'ovaire féminin, A et ovin, B. Anonymes

2. Ovogenèse et folliculogénèse

L'ovogenèse correspond à l'ensemble des processus permettant la croissance et la maturation d'un ovogonie jusqu'au stade d'ovocyte mûr. La folliculogénèse correspond à la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il se met en place lors de la vie foetale jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation et son involution. L'ovogenèse et la folliculogénèse s'accomplissent en parallèle au sein du cortex.

Chez les deux espèces, ces processus apparaissent très tôt, dès les premières semaines de la vie fœtale.

Chez l'humain, vers la fin de la 3^e semaine de développement, les cellules germinales primordiales (ou gonocytes primordiaux) se distinguent dans la paroi de l'allantoïde (Czyba and Montella 1993). Vers la 4^{ème} semaine de développement, les gonocytes primordiaux tout en se multipliant activement par mitose, migrent le long du mésentère dorsal par mouvements amiboïdes actifs, mais aussi par voie sanguine, pour se retrouver dans les futures crêtes génitales. À la 6^e semaine, le mésenchyme de la crête génitale se condense pour former les cordons sexuels primaires mais ce n'est qu'à la 8^{ème} semaine que l'ovaire se différencie histologiquement. Les gonocytes primordiaux arrivés dans les crêtes génitales augmentent de volume et continuent à se diviser par mitose pour donner les ovogonies. Entre la 8^{ème} et la 13^{ème} semaine de développement, les premières ovogonies entrent en prophase de 1^{ère} division de méiose et se bloquent au stade diplotène. Elles vont ensuite s'associer à des cellules somatiques pour former les follicules primordiaux. Au 9^{ème} mois toutes les ovogonies sont entrées en méiose. Le follicule primordial est constitué d'un ovocyte bloqué au stade diplotène de la 1^{ère} méiose et de quelques cellules aplaties : les cellules folliculeuses. Il est entouré de cellules stromales sans cellule apparente de la thèque. Les follicules primordiaux constituent un stock fini et, une fois leur développement initié, vont croître jusqu'à l'ovulation ou dégénérer par atresie à n'importe quel stade de développement (Skinner 2005).

Chez la brebis, les mêmes phénomènes sont observés avec des différences chronologiques liées aux spécificités des deux espèces (Figure 3).

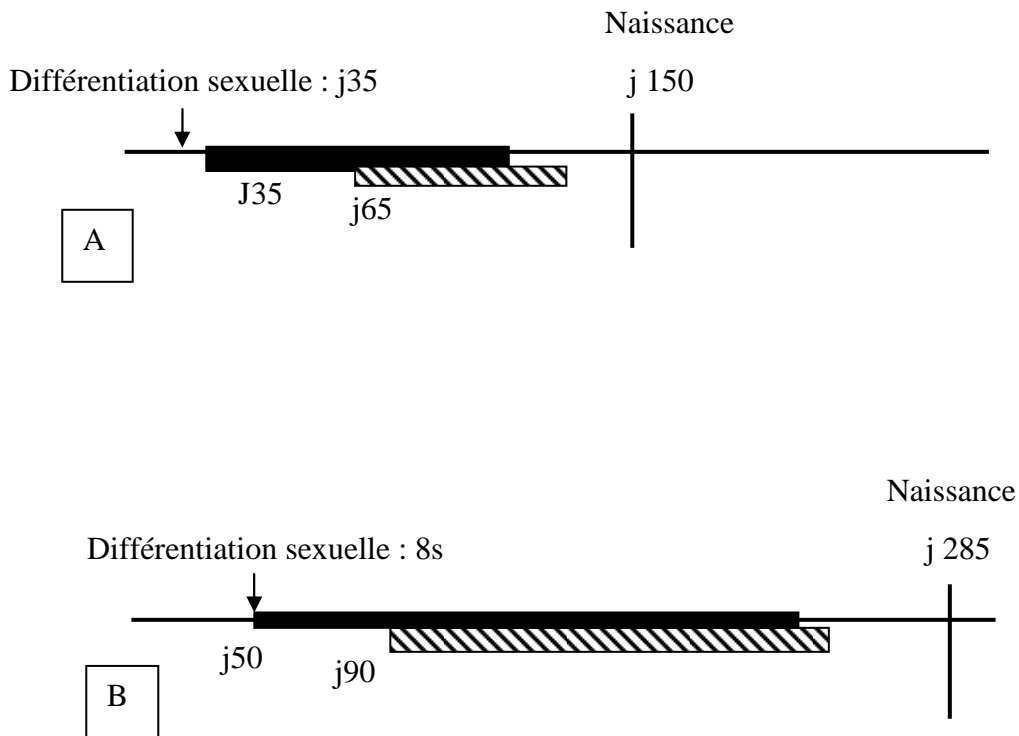


Figure 3: Chronologie du début de l'ovogenèse, pendant la vie fœtale, chez la brebis A et la femme B. J35 et J50 représentent l'âge de la première mitose, J65 et J 90 correspondent à l'âge de la première prophase au stade diplotène. La barre noire représente la période de mitose des ovogonies et la barre striée montre la période où les premières prophases méiotiques sont présentes. (Schéma modifié à partir de Mauléon 1969).

Il faut ensuite attendre la puberté pour que la folliculogénèse soit complète, mais dans l'ovaire foetal on retrouve des follicules en voie de maturation, et dès la naissance on retrouve des follicules à des stades antraux très évolués (Sforza *et al.* 2003).

Pendant la folliculogénèse complète, le follicule ovarien évolue du follicule primordial d'un diamètre de 20 μm pour la brebis et 30 μm pour la femme au follicule ovulatoire d'un diamètre de 13 mm pour la brebis (Hirshfield 1991) et de 20 mm pour la femme (Gougeon 1986). Le follicule primordial est constitué d'un ovocyte entouré de quelques cellules folliculeuses aplaties. La croissance folliculaire est le fait d'une croissance de l'ovocyte, de la multiplication des cellules de la granulosa (CG) (50 à 100 millions en fin de maturation) et de la formation d'une cavité creusée entre les CG et remplie d'un liquide qui constitue l'antrum.

L'augmentation des dimensions de cette cavité est essentiellement responsable de l'accroissement de taille du follicule.

- Le follicule primordial se compose d'un ovocyte bloqué en prophase de première division de méiose et d'une couche d'une dizaine de cellules folliculaires aplaties.
- Après initiation de la croissance, le follicule devient primaire (les cellules folliculeuses se transforment en cellules cubiques).
- C'est au stade secondaire (au moins 2 couches de cellules cubiques) qu'apparaît la zone pellucide entourant l'ovocyte.
- A la fin de la croissance du follicule secondaire, les cellules de la thèque apparaissent en dehors de la membrane de Slavjanski, le follicule devient préantral. La taille du follicule augmente par multiplication des cellules de la granulosa. Des espaces intercellulaires se constituent.
- Au stade de follicule tertiaire une cavité se forme par confluence des différents espaces intercellulaires de la granulosa, l'antrum. La thèque externe apparaît par différenciation des certaines cellules de la thèque interne qui deviennent polyédriques. La croissance s'accélère par augmentation du volume de l'antrum jusqu'à former le follicule pré ovulatoire ou follicule de De Graaf.

Chez l'humain ou chez l'ovin, dès la vie foetale et tout au long de la vie, le stock des follicules primordiaux diminue par atresie folliculaire : 7 millions à 7 mois de vie foetale, 1 million à la naissance, 400 000 à la puberté pour la femme (Gougeon 1986); chez la brebis 1 millions à 2 mois, 160 000 à la naissance, 50 000 à la puberté (Driancourt *et al.* 1985).

À partir de la puberté, seul un faible pourcentage des follicules va entrer en croissance pour donner le ou les follicules ovulatoires, les autres entreront en atresie par phénomène d'apoptose.

Chez la femme sur les 400 000 follicules primaires contenus dans les ovaires à la puberté, seuls 400 environ atteindront le stade de follicule préovulatoire, les autres (99,9% des follicules) seront éliminés par atresie. La ménopause survient quand la réserve des follicules chute entre 100 et 1000 follicules (Gougeon 1986). Chez la brebis il n'existe pas de ménopause, l'activité génitale de l'individu s'arrête avec sa mort.

Chez la brebis, 1 à 3 follicules entrent en croissance par jour, et 20 pour la jeune femme (Driancourt 2001). Cette croissance du follicule se déroule sur deux périodes distinctes : une croissance basale longue suivie d'une croissance terminale rapide (diZerega and Hodgen 1981).

Pendant la croissance du follicule du stade primordial au stade préovulatoire, l'ovocyte entre également en croissance. En dehors de sa méiose, c'est pendant les premières phases de la folliculogénèse, avant la formation de l'antrum que l'ovocyte voit la plus grande partie de sa croissance se réaliser (Eppig 2001; Liu *et al.* 2006) (Figure 4). Dès la vie fœtale, il est en prophase I et reste bloqué jusqu'à la puberté ; certains ovocytes continueront leur méiose s'ils sont associés à un follicule préovulatoire. Au moment de l'estrus pour la brebis et du pic ovulatoire chez la femme, la libération de LH entraînera la maturation méiotique *in vivo* jusqu'au stade de métaphase II. Après l'ovulation, l'ovocyte sera activé par le spermatozoïde, au moment de la fécondation et il achèvera alors sa méiose (Figure 5). S'il n'y a pas de fécondation, l'ovocyte dégénérera (Czyba and Montella 1993; Driancourt 2001).

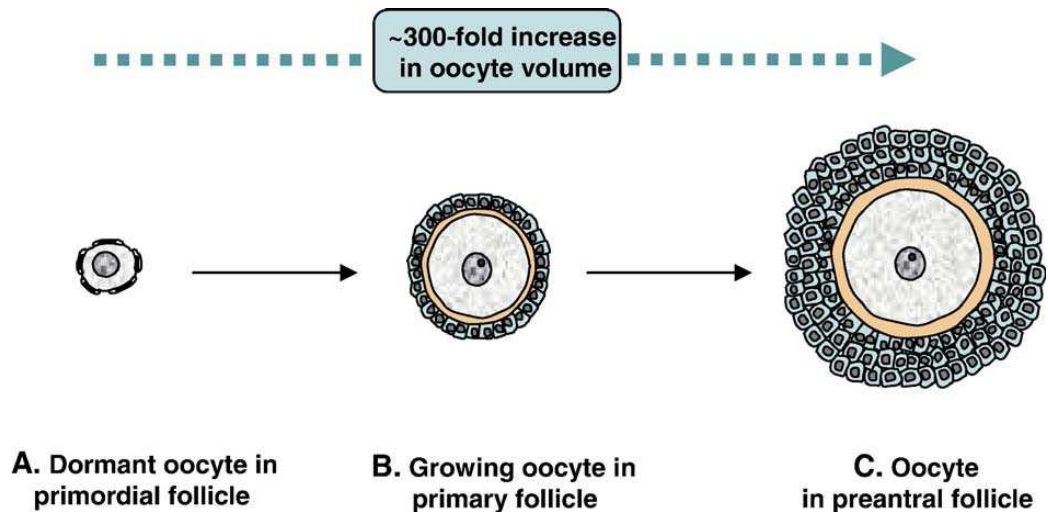


Figure 4: Croissance ovocytaire chez la souris. (A) Ovocyte de souris en “sommeil” dans un follicule entouré par des cellules pré-granulosa aplaties. (B et C) L’ovocyte et le follicule se développent en coordination mais pas simultanément. L’ovocyte croît très rapidement pour atteindre 300 fois son volume initial. Les cellules de la granulosa dans le même temps n’auront proliféré et formé que 3 couches de cellules cuboïdales (Liu *et al.* 2006).

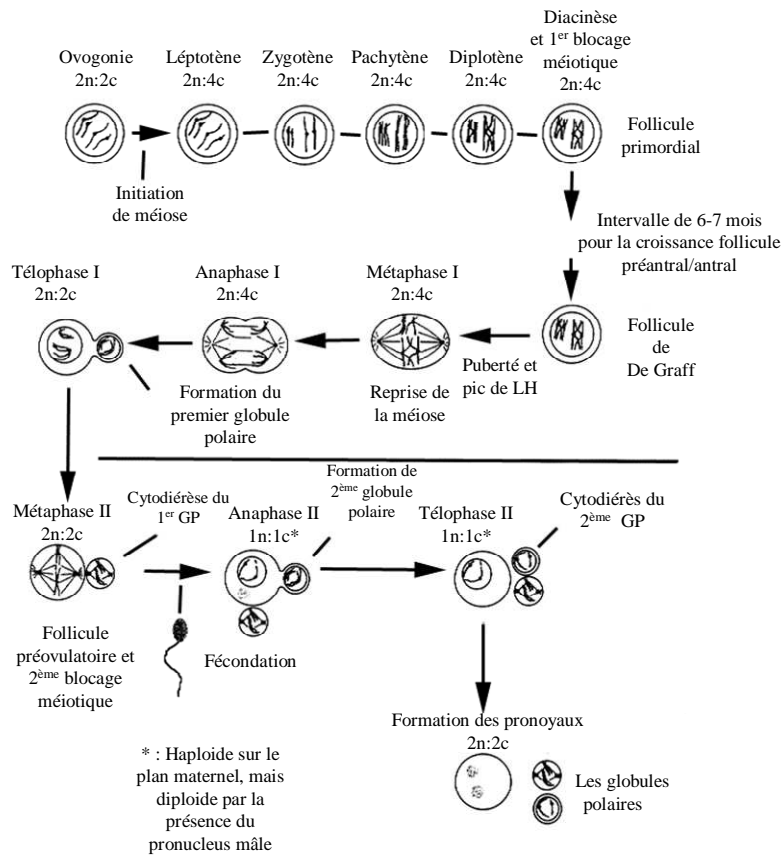


Figure 5 : Les étapes de la méiose durant le développement ovocytaire (Briggs et al., 1999).

◆ Croissance basale

La croissance basale comprend l'initiation de la folliculogénèse jusqu'au stade de follicule antral d'un diamètre de 2 mm pour les deux espèces (Driancourt 2001). Les différents facteurs qui interviennent dans ce processus seront développés dans un chapitre ultérieur.

◆ Croissance terminale

À partir de follicules antraux d'un diamètre de 2mm, pendant le processus de folliculogénèse terminale les follicules deviennent sensibles aux gonadotrophines et vont pour certains d'entre eux croître jusqu'au stade de follicule pré-ovulatoire. Cette partie met en jeu également un nombre important de facteurs de croissance qui ne seront pas développés dans

ce chapitre. A partir d'un diamètre de 2 mm, la croissance des follicules s'accélère par rapport au début de la croissance folliculaire, en raison surtout de l'augmentation de la cavité antrale. Les cellules de la granulosa deviennent dépendantes de facteurs endocrines par l'intermédiaire des gonadotrophines FSH et LH. Pour les deux espèces, cette phase de croissance terminale se décompose en 3 périodes : une phase de recrutement, une phase de sélection et une phase de dominance (diZerega and Hodgen 1981; Driancourt 2001) (Figure 6).

- Phase de recrutement : une cohorte de follicules antraux dits sélectionnables entre en phase de croissance terminale. La taille des follicules est comprise entre 2 et 5 mm pour la femme et autour de 2 mm pour la brebis.
- Phase de sélection : un seul follicule va devenir préovulatoire (chez la femme et la brebis mono-ovulante), il est sélectionné parmi la cohorte de follicules recrutés. Le follicule est sélectionné, lorsqu'il atteint 4-6 mm de diamètre chez la brebis et 8-10 mm chez la femme, l'accroissement de l'expression des récepteurs à FSH et l'apparition des récepteurs à LH sur les cellules de la granulosa rendent le follicule sélectionné plus sensible à FSH et LH. Son développement se poursuit malgré la baisse de concentration en FSH.
- Phase de dominance : la chute des gonadotrophines et le fait que le follicule sélectionné achève sa croissance en exerçant un effet pro-apoptotique, entraînent l'entrée en atresie des autres follicules recrutés. Pour la femme le follicule sélectionné de 6 à 9 mm augmente de taille en 5 jours pour atteindre 20 mm au stade préovulatoire (Gougeon 1986). Pour la brebis, le follicule de 2 mm de diamètre atteint la taille du follicule pré-ovulatoire de 8-13 mm en 2 à 4 jours (Tsonis *et al.* 1984)

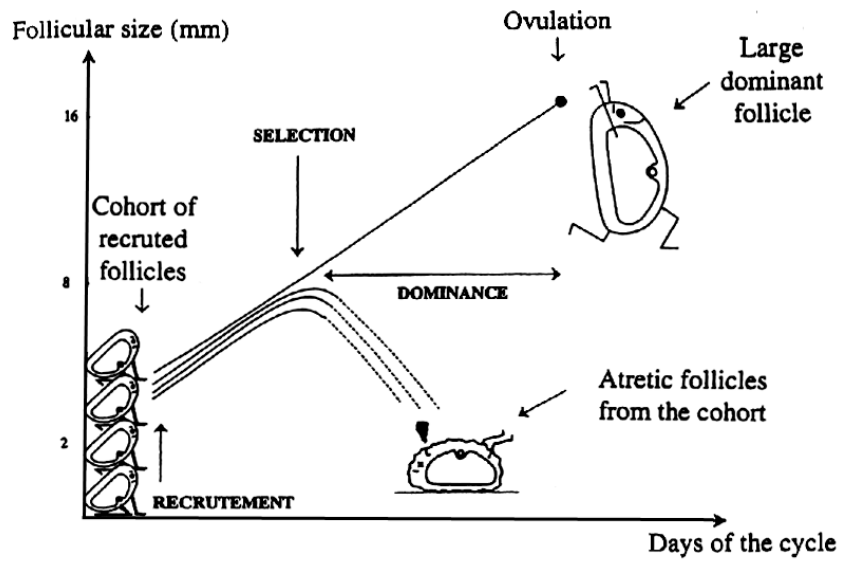


Figure 6 : croissance terminale. (Driancourt 2001)

Le processus qui va amener les follicules de réserve jusqu'au stade de follicule sélectionnable est un processus long (160 jours) quasiment identique pour les deux espèces. La maturation finale du follicule sélectionnable jusqu'au follicule ovulatoire est de 14 jours pour la femme et ne représente que quelques jours (2 à 4 jours) pour la brebis (Figure 7).

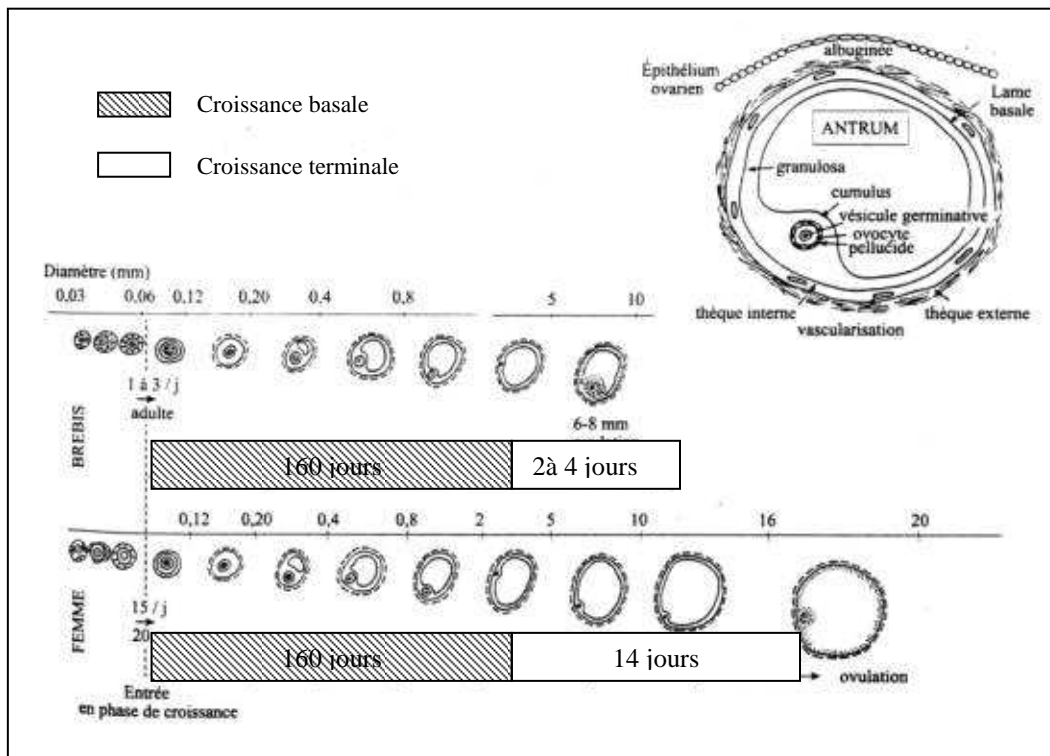


Figure 7: durée de la folliculogénèse chez la femme et la brebis. Schéma modifié (Driancourt 2001)

B. Les différences :

1. Taille de l'ovaire :

Chez la femme adulte les dimensions sont de 3 x 2 x 1 cm avec un poids de 10 à 20g, chez la brebis de 1,5 x 1 x 0,5 cm en moyenne avec un poids de 3 à 5 g.

2. Longueur du cycle, contrôle hormonal de la Croissance terminale

Chez les deux espèces pendant la phase folliculaire, l'estradiol et l'inhibine B exercent un rétrocontrôle négatif sur la libération de LH/FSH jusqu' à un certain seuil où l'estradiol produit par le follicule dominant exerce un rétrocontrôle positif provoquant une décharge ovulante de LH/FSH.

Pendant la phase lutéale chez la femme le corps jaune produit de la progestérone, de l'estradiol et de l'inhibine A inhibant la FSH et donc la croissance folliculaire terminale.

La croissance terminale ne peut s'effectuer qu'en phase folliculaire pour la femme.

Chez la brebis le corps jaune produit uniquement de la progestérone permettant la présence de FSH, ce qui permet plusieurs entrées en croissance terminale (2 à 3 vagues folliculaires) pendant la phase lutéale. La progestérone bloquant la décharge ovulante de LH, seule la vague folliculaire qui intervient pendant la phase folliculaire donnera une ovulation chez la brebis.

Chez la plupart des mammifères et en particulier chez la femme et la brebis, la phase lutéale est assez constante et dure environ 14 jours. Chez la brebis cette phase associée à une phase folliculaire de 3 jours (liée à la croissance terminale du follicule sélectionnable jusqu'au follicule ovulatoire) donne un cycle estral de 17 jours (Jainudeen and Hafez 1993). Chez la femme cette phase lutéale associée à une phase folliculaire de 14 jours (liée à la croissance terminale du follicule sélectionnable jusqu'au follicule ovulatoire) donne un cycle menstruel de 28 jours (Figure 8).

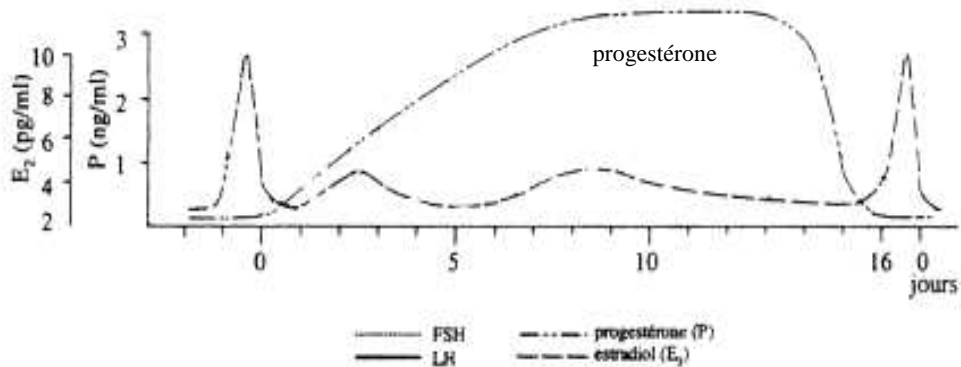
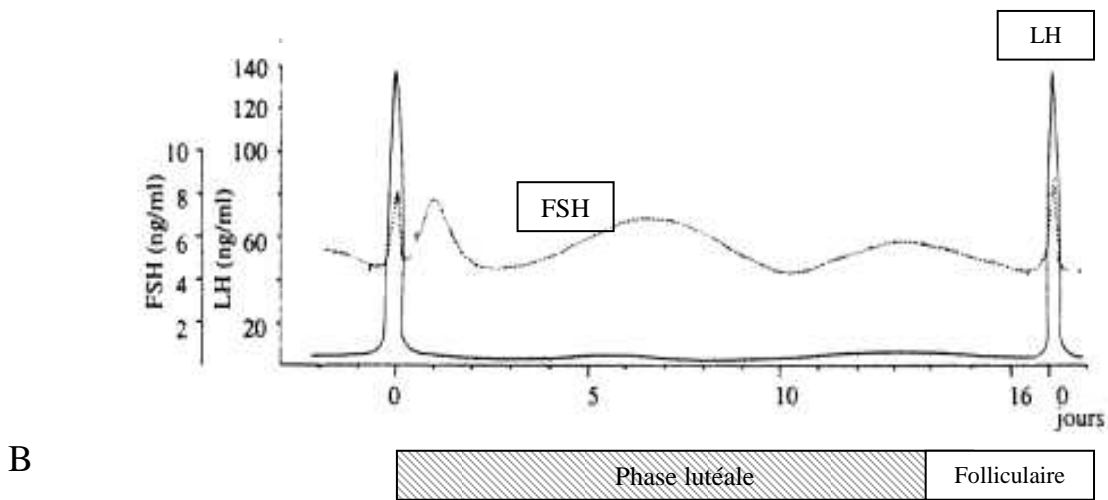
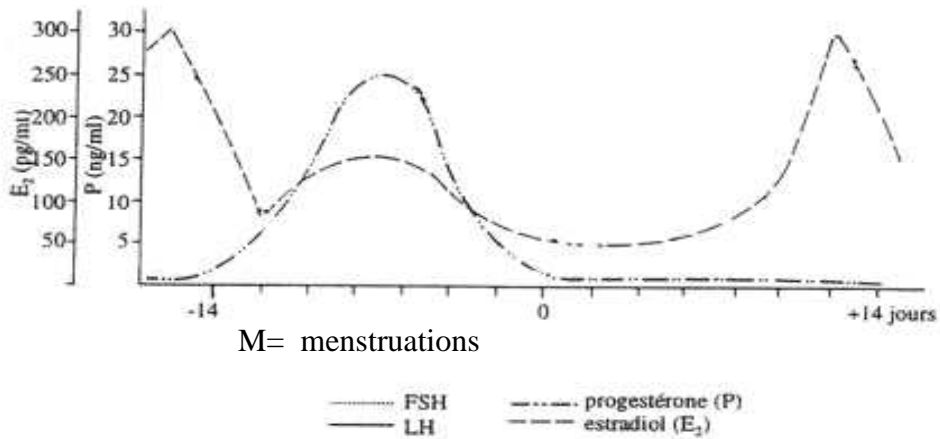
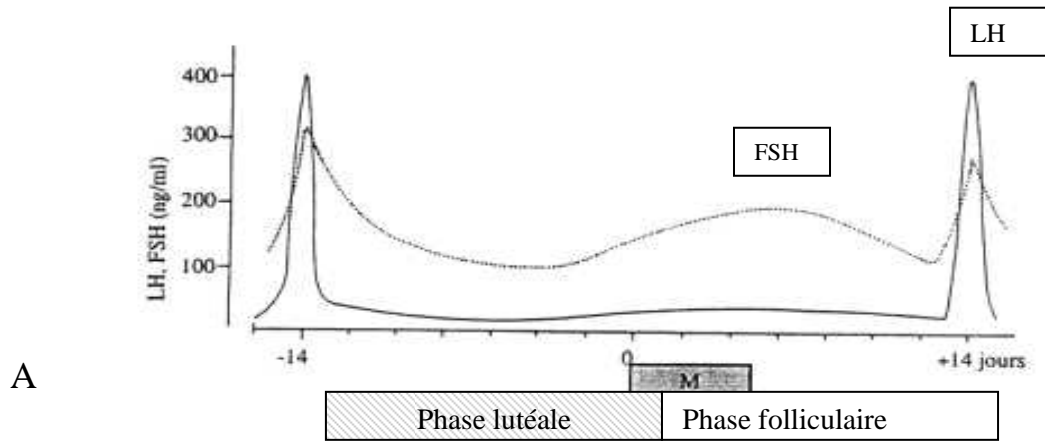


Figure 8: contrôle hormonal chez la femme (A) et la brebis (B) schémas modifiés (Driancourt 2001)

3. Taux d'ovulation

Chez les ovins la puberté débute vers l'âge de 5 mois, les cycles durent toute la vie de l'animal. En zone tempérée, les ovins sont des animaux polyestriens saisonniers (plusieurs cycles d'estrus par saison) (Driancourt et al. 1985). Les brebis sont anovulatoires au printemps et en été ; la saison de reproduction commence dès la diminution de la durée du jour . L'activité sexuelle est déclenchée par la sécrétion nocturne de la mélatonine qui active l'axe hypothalamo-hypophysaire.

L'ovulation a lieu spontanément au cours de chaque cycle. Le taux d'ovulation diffère selon la race : les races Mérinos d'Arles ou Ile de France ont comme la femme une seule ovulation par cycle alors que les races comme Romanov ou Finn ont un nombre d'ovulation qui varie entre 2 et 4 par cycle (Land *et al.* 1973).

Ils existent des similitudes entre les deux espèces qui positionnent la brebis comme un modèle d'étude intéressant, mais compte tenu des différences existantes, un travail de recherche sur le modèle humain s'avère nécessaire.

II. Folliculogénèse : croissance basale

Les mécanismes qui régissent la folliculogénèse *in vivo* sont encore méconnus. La première phase de croissance folliculaire jusqu'au follicule antral de moins de 2mm se déroulent sans le soutien de gonadotrophines et les travaux actuels tendent à démontrer que les premières étapes sont sous la dépendance de contrôles paracrines inhibiteurs et stimulateurs.

Le couple kit ligand/c-kit en dehors de son rôle anti apoptotique, (Jin *et al.* 2005; Carlsson *et al.* 2006; Moniruzzaman and Miyano 2007) est impliqué dans l'initiation de la croissance. Chez le rat, au 14^e jour de culture, l'adjonction de kit ligand recombinant dans le

milieu augmente la proportion de follicules entrés en croissance : 83% vs 55% pour la culture témoin (Parrott and Skinner 1999). Chez la souris, des résultats comparables ont été retrouvés en culture lorsque le milieu est supplémenté avec du kit ligand (Hutt *et al.* 2006). Classiquement, le kit ligand est décrit comme étant sécrété par les cellules de la granulosa (CG), et son action sur l'ovocyte s'exécute via son récepteur (c-kit) présent sur la membrane ovocytaire. Chez l'humain, la protéine kit ligand est présente dans les CG de tous les stades folliculaires ; ckit dans l'ovocyte et les CG uniquement des follicules primordiaux (Hoyer *et al.* 2005). Dans une autre étude, c-kit est exprimé dans l'ovocyte et les CG des follicules primaires (Carlsson *et al.* 2006). L'initiation de croissance serait liée à une augmentation d'AMPc (Gougeon 2005), la sécrétion de SCF étant elle même liée à une augmentation intracellulaire d'AMPc (Packer *et al.* 1994).

Cette élévation d'AMPc serait sous la dépendance de divers facteurs inhibiteurs ou stimulateurs. Confirmant une étude menée chez la souris (Durlinger *et al.* 2002), 100 ng/ml d'AMH recombinant de rat au bout de 7 jours de culture empêchent l'initiation de croissance chez l'humain (Carlsson *et al.* 2006). La somatostatine (SST) (Goddard *et al.* 2001), comme la protéine de retinoblastome (pRb) (Picton 2001), la protéine du gène suppresseur de la tumeur de Wilms (WT1) (Hsu *et al.* 1995) ont montré un effet inhibiteur. Ces facteurs maintiendraient la réserve de follicules.

Inversement, l'initiation de la croissance folliculaire pourrait s'expliquer par l'augmentation de facteurs stimulateurs. La présence de Fibroblast Growth Factor (bFGF) en culture chez le rat, abaisse le nombre de follicules primordiaux, 15% vs 45% pour la culture contrôle (Nilsson *et al.* 2001). L'expression de bFGF est également détectée chez l'humain (Ben-Haroush *et al.* 2005). Chez le rat, l'injection de Bone Morphogenic Protein 7 (BMP7) dans les bourses ovariennes engendre une baisse de la population des follicules primordiaux (Lee *et al.* 2001). Toujours chez le rat, Leukemia Inhibiting Factor (LIF) en culture, permet une transition des follicules primordiaux aux follicules primaires à 59% vs 45% pour la

culture contrôlée (Nilsson *et al.* 2002). Ces résultats ont été retrouvés pour Bone Morphogenic Protein (BMP) 4 (Nilsson and Skinner 2003), KGF7 (Kezele *et al.* 2005). D'autres facteurs tels que Epidermal Growth Factor (EGF) joueraient un rôle dans l'initiation de croissance (Picton 2001; Silva *et al.* 2004) (Figure 9).

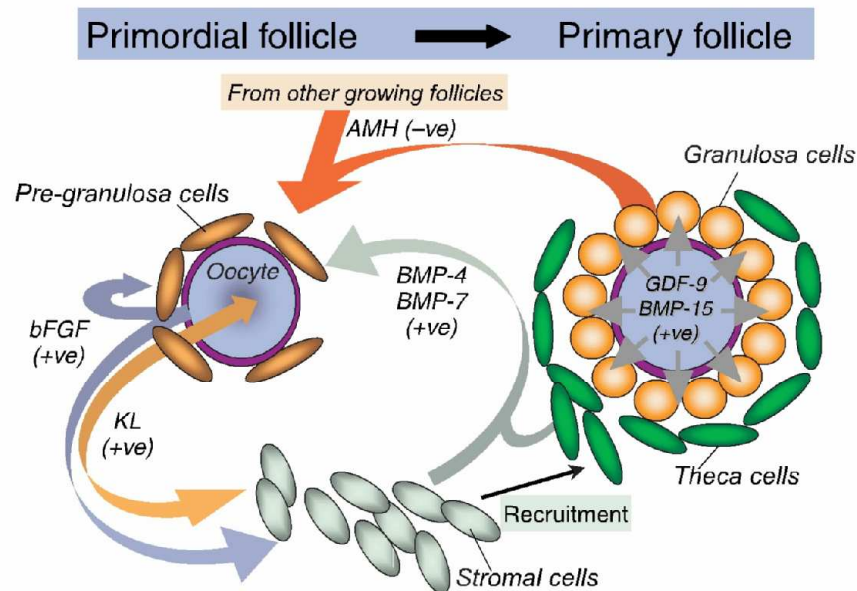


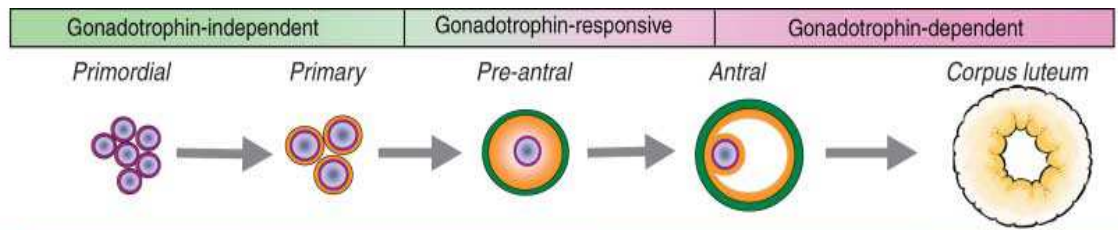
Figure 9 : Signaux d'interactions (+ve stimulateur ; -ve inhibiteur) qui interviennent dans la transition du follicule primordial au follicule primaire. Le KL sécrété par les cellules de la pré-granulosa et bFGF sécrété par l'ovocyte ont des effets stimulateurs l'un sur l'ovocyte et l'autre sur les cellules de la pré-granulosa ; ils sont impliqués également dans le recrutement des cellules thécales à partir des cellules stromales environnantes. Les cellules stromales et thécales sécrètent BMP4 et BMP7 qui permettent l'activation et augmentent la survie folliculaire. GDF9 et BMP15 sécrétés par l'ovocyte permettent la prolifération des cellules de la granulosa, l'expression de KL et la formation de la thèque. Les cellules de la granulosa sécrètent l'AMH qui freine l'initiation des follicules primordiaux. (Knight and Glister 2006)

Parmi les 40 membres de la super famille des Transforming Growth Factor β (TGF β) (Chang *et al.* 2002), le Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) et Bone Morphogenic Potein 15 (BMP15) semblent essentiels pour le passage des follicules primaires aux follicules secondaires. Plusieurs études étayent ces hypothèses : des souris déficientes (Knock Out) en GDF9 ((Dong *et al.* 1996) et des brebis déficientes en GDF9 et BMP15 (Galloway *et al.* 2000; Hanrahan *et al.* 2004) sont stériles et ont leurs follicules bloqués au stade primaire. Ces mêmes résultats ont été obtenus avec des brebis immunisées contre GDF9 et /ou BMP15 (Juengel *et al.* 2004). Chez l'humain, des insuffisances ovariennes ont été observées avec des mutations sur le gène BMP15 (Di Pasquale *et al.* 2004) ou GDF9 (Kovanci *et al.* 2007).

Hreinsson et al., en 2002 ont obtenu un plus grand nombre de follicules secondaires en supplémentant en GDF9 le milieu de culture de tissu ovarien (Hreinsson *et al.* 2002).

Du follicule secondaire au follicule préantral tardif jusqu'au follicule antral, différents facteurs sont impliqués dans la croissance et la multiplication des cellules de la granulosa, Les facteurs stimulateurs sont GDF9, growth hormone (GH), bFGF, activine A, EGF, TGF- β 1, TGF- β 2, IGFI, keratinocyte growth factor (KGF) et Hepatocyte Growth factor (HGF). Les facteurs inhibiteurs sont BMP15, TGF- α , EGF, HGF et KGF (Gougeon 2005), Figure 10. À partir du follicules préantral et de la présence de la thèque, il existera une communication entre les cellules de la granulosa, les cellules thécales et l'ovocyte (Figure 11).

Actuellement, ces théories, et en particulier celle du stock définitif ovocytaire établi dès la naissance, sont remises en question avec la notion de cellules souches germinales chez l'adulte. Chez la souris, la notion de régénération du stock folliculaire a été avancée en 2004, Johnson et al. décrivent des cellules souches germinales capables de se transformer en follicules primordiaux puis en follicules en croissance. Dans un premier article, ils les localisent dans l'épithélium ovarien de souris (Johnson *et al.* 2004). Dans un second article, ils décrivent l'origine de ces cellules souches dans la moelle osseuse (Johnson *et al.* 2005). Chez l'humain adulte, une équipe a décrit une néo-ovogenèse à partir de l'épithélium de surface de l'ovaire. Cet épithélium pourrait être la source de nouveaux ovocytes et la fragmentation de ses invaginations permettrait la formation des follicules (Bukovsky *et al.* 2004; Bukovsky *et al.* 2005). Ces différentes études font l'objet de polémiques relayées par de nombreux auteurs (Telfer *et al.* 2005; Eggan *et al.* 2006; Skaznik-Wikiel *et al.* 2007) mais orientent les recherches sur de nouvelles voies.



LIGAND [main source]	PRIMORDIAL	PRIMARY TO PRE-ANTRAL	ANTRAL	CORPUS LUTEUM
AMH [GC from primary to early antral stage]	From GC of <i>growing</i> preantral follicles: ↓ Primordial follicle recruitment	↓ GC mitosis and FSH-responsive follicle progression??	?	?
BMP-4 BMP-7 [stroma, TC]	From stroma/theca: ↑ Primordial follicle activation	↑ GC proliferation, preantral follicle growth and follicle survival	↑ Basal and/or FSH-induced E2, inhibin, activin production and ↑ GC proliferation; ↓ P4 production by GC; ↓ Basal and LH-induced androgen production by TC	↓ GC luteinization / atresia; May ↓ ovulation
GDF-9 [oocyte from primordial / primary stage]	? Possible role in ↑ primordial follicle formation (sheep)	↑ Follicle progression beyond primary stage (essential)	↑ GC proliferation and ↓ P4 production; ↑ Cumulus expansion; may regulate FSH-responsiveness of GCs and influence ovulation rate (sheep)	?
BMP-15 [oocyte from primordial / primary stage]	?	↑ Follicle progression beyond primary stage (essential in sheep, but <i>not</i> rodent)	↑ GC proliferation and ↓ P4 production; may regulate FSH-responsiveness of GCs and influence ovulation rate (sheep)	?
BMP-6 [oocyte, GC from primordial / primary stage]	?	?	↑ GC proliferation; ↓ P4 production by GC; ↓ TC androgen production	↓ GC luteinization / atresia;
TGF-β [TC, GC, oocyte]	?	? Conflicting data	↓ basal and LH-dependent androgen production by TC; conflicting data for GC	May mediate luteotrophic action of prolactin (rat); ↑ inhibin/activin βB expression in granulosa-luteal cells (human)
Activin [GC from late preantral stage]	?	↑ GC proliferation, ↑ FSHR and FSH-induced aromatase expression; ↓ LH-induced androgen production by TC	↑ GC proliferation, ↑ FSHR and FSH-induced aromatase expression; ↓ LH-induced androgen production by TC; ↑ oocyte maturation	↓ GC luteinization / atresia; ↓ luteal P4 production
Inhibin [GC of antral follicles]	?	?	↑ LH-induced androgen production by TC; may ↓ growth of subordinate follicles	May ↑ luteal P4 production (human / primate only)

Figure 10: résumé du rôle joué par les membres de la superfamille des TGF- β pour différentes étapes du développement folliculaire (Knight and Glistler 2006).

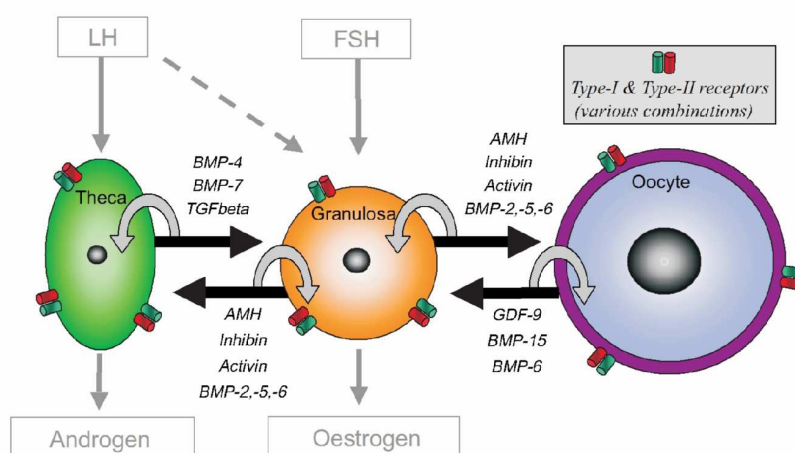


Figure 11 : Les membres de la TGF β superfamille font parti des ligands extracellulaires impliqués dans les communications entre les cellules thécales et celles de la granulosa, et les cellules de la granulosa et l'ovocyte. Les signaux autocrines (fines flèches grises) et paracrines (épaisses flèches noires) dépendent de l'expression de combinaisons des récepteurs de type I et II à la surface cellulaire. (Knight and Glistler 2006)

III. Principe de cryobiologie

Le principe de cryobiologie est de conserver par le froid (cryoconservation), des cellules vivantes pendant un temps indéfini en bloquant leur activité métabolique, tout en conservant leur intégrité fonctionnelle.

Le froid ralentit les réactions enzymatiques intervenant dans les métabolismes biochimiques cellulaires. Une réaction biochimique qui dure 1 seconde à 27 °C, dure 4 secondes à 4°C, et jusqu'à 2.10^6 années à -170 °C (Baudot *et al.* 2000). A l'échelle humaine, le cours du temps d'un système biologique placé à la température de l'azote liquide (- 196°C) semble arrêté: les métabolismes cellulaires sont comme figés, permettant de conserver un organisme vivant à très basse température.

Par ailleurs, dans l'azote liquide, aucune réaction thermique ne peut se dérouler dans des systèmes aqueux, l'eau liquide n'existe plus en dessous de -130°C. Les seules réactions possibles, à -196°C dans les systèmes aqueux congelés, sont la formation des radicaux libres et la production de cassures des macromolécules due aux radiations ionisantes. Après une période suffisamment longue, ces ionisations, peuvent produire des cassures ou des dommages sur l'ADN qui peuvent devenir délétères après la décongélation. Cette théorie reste toujours «non confirmée»: il n'existe pas de preuve de changements chromosomiques et génétiques induits par la conservation à -196°C (Ashwood-Smith and Friedmann 1979).

Les changements d'état de l'eau, en particulier le passage de l'état liquide à l'état solide sont les événements majeurs mis en jeu dans la cryobiologie. La majorité des cellules eucaryotes sont composées de 50 à 99 % de molécules d'H₂O, cette eau cellulaire étant composée d'environ 60 % d'eau libre (responsable des échanges de signaux cellulaires) et de 40% d'eau liée (responsable de la structure tridimensionnelle du monde du vivant) (Meryman 1966).

A la pression de 1 ATA, la température de fusion/solidification de l'eau pure est de 0°C, sa température de surfusion théorique étant de -49°C en conditions théoriques optimales. Entre ces deux températures, l'eau est dans un état liquide instable où tout événement (choc mécanique ou thermique...) peut déclencher l'initiation des cristaux de glace. À des températures comprises entre 0°C et -103°C, la formation de cristaux de glace se produit. Ces cristaux se forment aussi bien pendant la phase de congélation que de décongélation. En dessous de -103°C pour l'eau pure, l'eau se solidifie sous un état non cristallisé appelé état amorphe ou état vitreux (Meryman 1966). Pour un système biologique, ces températures sont modifiées, en particulier pour la température de fusion/solidification qui se situe autour de -6°C.

L'initiation des cristaux de glace s'effectue à partir de petits grains de cristaux, phénomène aussi appelé « seeding » ou nucléation. Le « seeding » engendre une réaction exothermique qui entraîne un phénomène de fusion/cristallisation favorable à la formation de cristaux de grande taille. Ces cristaux vont entraîner un effet délétère par 3 principaux mécanismes (Mazur 1984) :

- Effets de solution : la glace en se formant va rejeter les solutés qui étaient dissous dans l'eau libre et va entraîner une déshydratation. Les structures protéino-lipidiques, sensibles aux changements de concentration en solutés subiront des modifications connues sous le nom « d'effet de sels » ou « effet de solution ». Cet effet va entraîner une dessiccation et une dénaturation protéino-lipidique létale pour la cellule (Figure 12).
- Dissection par la glace : la forme et la taille des cristaux peuvent altérer la cellule par lésions mécaniques directes (Figure 12).
- Explosions cellulaires et stretching des membranes : les cristaux en se formant et se dissociant vont créer des chocs osmotiques et par augmentation brutale du volume entraîner la mort cellulaire (Figure 12).

Pour limiter ces phénomènes et conserver l'intégrité cellulaire il est possible de jouer sur différents paramètres :

⇒ *La composition du milieu extracellulaire*

⇒ *La nature et les propriétés du cryoprotecteur*

⇒ *La vitesse de refroidissement*

⇒ *La vitesse de réchauffement*

A. Composition du milieu extracellulaire

Elle doit être le plus proche possible du milieu où se trouvent les cellules in vivo. Le pH doit être déterminé avec précision, car au cours de la congélation il peut varier de façon importante. Les milieux les plus souvent employés sont le Phosphate Buffered Solution (PBS) ou un milieu de culture cellulaire dont la composition de base est proche du PBS : BM1, α MEM, TCM199, Leibovitz. Dans le cas de l'embryon, de l'ovocyte et du tissu ovarien, ce milieu est supplémenté par du sérum de veau fœtal ou sérum humain (10 à 20%) inactivé par la chaleur. Ces dernières années, le sérum a été remplacé par du substitut de sérum ou de la sérum albumine humaine HSA. Ceci a permis de diminuer les risques sanitaires et de maîtriser plus précisément la composition du milieu.

B. Utilisation de cryoprotecteurs

Par définition, les cryoprotecteurs sont des substances qui protègent la cellule des effets néfastes de la congélation. Dans le monde végétal et animal, certaines plantes et certains animaux utilisent des agents cryoprotecteurs pour se protéger des effets néfastes des basses températures (Wharton and Ferns 1995). La larve du parasite *Bracon cephi* accumule 25% de glycérol dans ses fluides corporels pendant l'automne pour tolérer les températures d'hiver aussi basses que -50°C (Kim *et al.* 2001). Les protéines «antigel» sont

essentiellement des glycopeptides, isolés par exemple des racines de carotte (*Daucus carota*) qui inhibent la recristallisation des cristaux et jouent ce rôle antigél (Smallwood *et al.* 1999).

En cryobiologie, deux types de cryoprotecteurs sont utilisés : intracellulaires et extracellulaires.

Les cryoprotecteurs intracellulaires, diffusibles ou pénétrants sont des substances organiques très solubles et de petit poids moléculaire.

Les plus utilisés en médecine de la reproduction sont :

- Le diméthyl sulphoxide (DMSO) : solvant des corps gras de faible poids moléculaire (PM : 78), il traverse rapidement les membranes cellulaires, mais possède une toxicité cellulaire importante.
- Le 1,2 propanediol ou propylène glycol (PROH) : dialcool de PM de 76 Da pénétrant rapidement les membranes cellulaires et d'une grande stabilité à l'état amorphe.
- L'éthylène glycol (EG) : dialcool (PM : 62)
- Le glycérol est un trialcool (PM 92) pénétrant lentement dans la cellule par un mécanisme actif. Il agit en fixant l'eau et en augmentant la résistance des membranes à la congélation.

Les cryoprotecteurs extracellulaires, non diffusibles, non pénétrants 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 (Kuleshova *et al.* 1999).

Parmi les sucres de haut poids moléculaire les disaccharides (ex : sucrose ou saccharose, trehalose) sont les plus utilisés.

L'action des cryoprotecteurs est multiple :

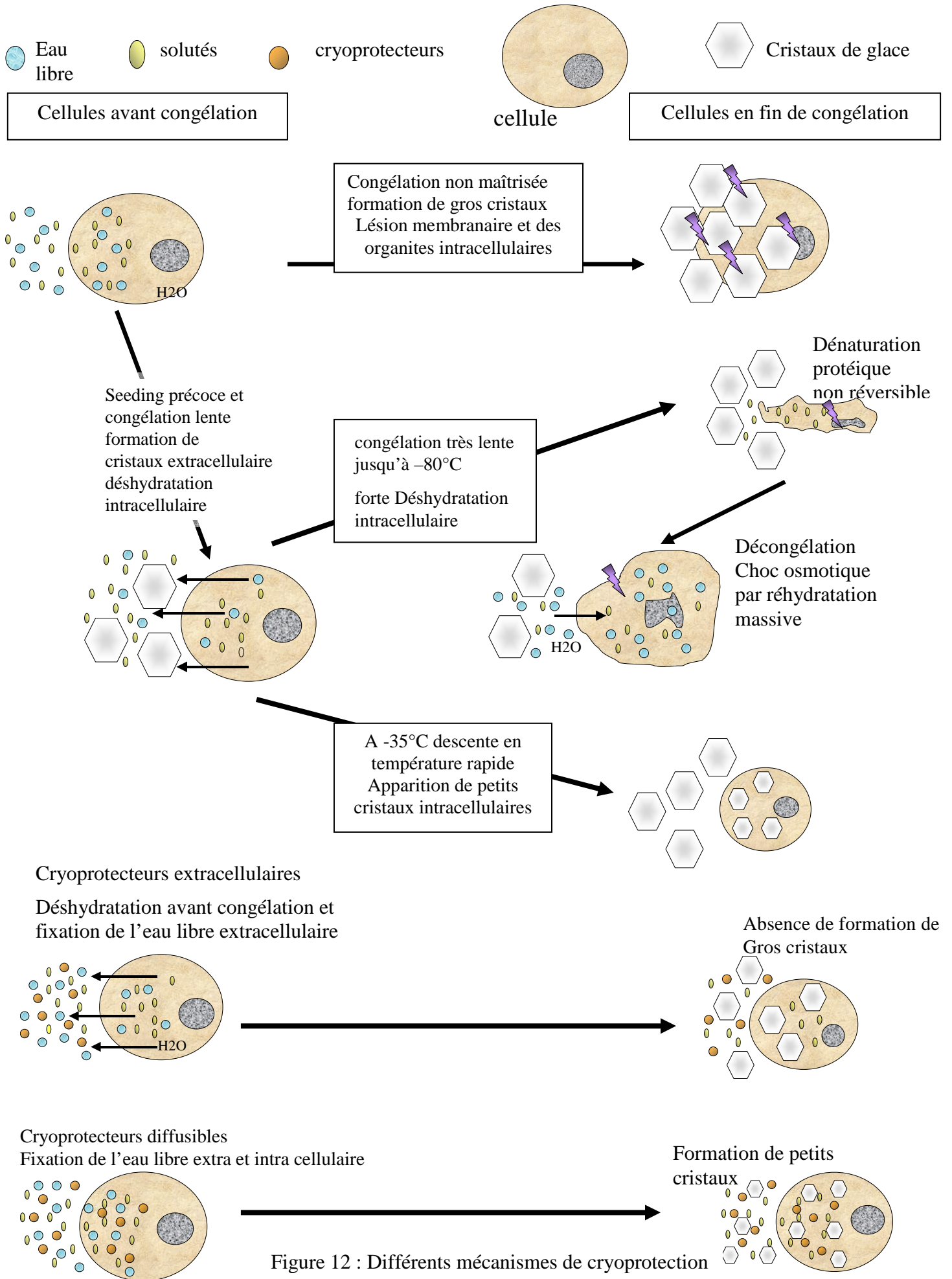
Les cryoprotecteurs intra et extracellulaires se lient à l'eau libre abaissant la fraction d'eau cristallisable disponible, les cryoprotecteurs interfèrent avec les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace. En effet, ces agents contiennent des groupements

électronégatifs capables de former des liaisons hydrogènes entre 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 (Emiliani *et al.* 2000).

Les cryoprotecteurs abaissent la température de cristallisation (T_m) au fur et à mesure que leur concentration augmente.

Sous pression atmosphérique (1 ATA), entre 0 °C et -6°C la forme des cristaux de glace est hexagonale, pour des températures inférieures à -6°C, les cristaux s'organisent sous une forme cubique moins agressive. Les cryoprotecteurs abaissent la température de la fusion de l'eau en dessous de -6°C favorisant l'apparition de cristaux cubiques (Boutron 1986).

Les cryoprotecteurs extracellulaires ont une action propre et vont entraîner une sortie d'eau de la cellule en entraînant une hyper-osmolarité extra-cellulaire et diminuent les risques de cristallisation. L'addition de sucres permet de réduire la toxicité par diminution de la concentration et du temps d'exposition au cryoprotecteur intra-cellulaire (Baudot and Odagescu 2004) (Figure 12).



C. Vitesse de congélation

A partir de travaux effectués sur de cellules, deux techniques principales peuvent être utilisées en cryobiologie pour cryoconserver des tissus biologiques. Une technique classique de congélation dite « lente » ainsi qu'une technique de vitrification exigeant un refroidissement rapide. Selon la figure 13, la technique de congélation lente utilisera une vitesse située sous la courbe correspondant au « pic classique de survie ». La vitrification utilisera des vitesses correspondant au plateau de vitrification.

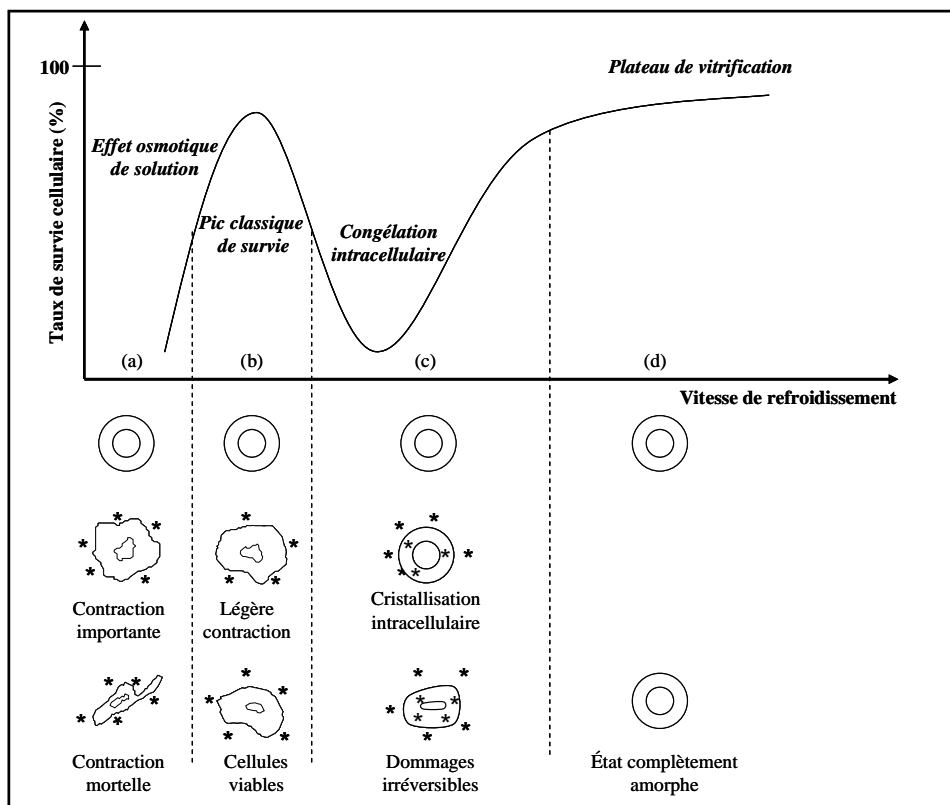


Figure 13 : Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement. (Baudot 1997). Cryopreservation d'organes par vitrification. Mesures calorimétriques et mesures diélectriques. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Grenoble.

1. Le refroidissement lent (pendant le « pic de survie »)

La plupart des protocoles à refroidissement lent se font en plusieurs étapes (Figure 14).

a) Le refroidissement des produits en phase liquide = Pente R1

Pendant cette première phase, les cellules ou le tissu sont en suspension dans le milieu contenant le cryoprotecteur. La vitesse de refroidissement ne doit pas être trop rapide afin de favoriser les échanges osmotiques de part et d'autre de la membrane cellulaire. La température de cette première phase descend jusqu'à la température S de surfusion.

Un abaissement progressif de la température produit une cristallisation préalable du milieu extracellulaire ce qui entraîne une sortie d'eau intracellulaire. Si cette baisse progressive se poursuit jusqu'à la température théorique de -103°C , la cellule sera fortement déshydratée (Figure 12).

b) "Le seeding": l'induction de cristallisation

Un choc mécanique ou thermique provoque la formation d'un premier cristal de glace et la température remonte brutalement jusqu'à la température Tc de congélation de la solution.

Dans le cas de l'embryon de mammifère, si la température S de surfusion est très basse, c'est à dire que l'écart entre la température S et la température Tc de congélation est supérieur à 5°C , les taux de survie embryonnaire après réchauffement sont très mauvais (Lornage 1994). A cette température de surfusion, la formation de glace extracellulaire produit immédiatement la formation de glace intracellulaire sans sortie d'eau possible entraînant des lésions cellulaires. L'intérêt du « seeding » est de déclencher la formation de cristaux de glace à une température relativement proche de la température de fusion/cristallisation (Figures 15 et 16). A cette température les cristaux extracellulaires vont se former avant la formation de cristaux intracellulaires, la concentration en solutés dissous augmente rapidement dans le

compartiment extracellulaire, l'équilibre osmotique se rétablit par un mouvement d'eau hors de la cellule permettant une déshydratation intracellulaire préalable (Mazur *et al.* 1974).

Dans les congélateurs programmés, un apport de frigories localisé est réalisé soit par application d'une barre métallique refroidie (de façon automatique ou manuelle), soit par l'envoi de « frigories » sous forme d'une entrée massive de vapeurs d'azote liquide dans la cuve du congélateur.

c) Les phases de congélation = Pente R2

Après la température T_c , se situe le plateau de congélation. Pendant cette période, les transformations physico-chimiques se poursuivent et peuvent donner lieu à des lésions cellulaires irréversibles. Le choix de la pente R2 est délicat et dépend de la nature de la cellule congelée, de sa perméabilité membranaire, de sa taille ainsi que du cryoprotecteur utilisé. Mazur a démontré que le rapport surface sur volume de la cellule détermine la vitesse de refroidissement : les cellules de diamètre élevé exigent une vitesse de refroidissement lente lors de la phase de congélation (Mazur 1984).

Les vitesses de congélation de $0,1^\circ\text{C}$ à $2^\circ\text{C}/\text{mn}$ permettent d'accroître la déshydratation cellulaire. Pour l'embryon et le tissu ovarien, une vitesse de $0,3^\circ\text{C}/\text{mn}$ est couramment choisie et jusqu'à des températures de $2^\circ\text{C}/\text{mn}$. Des vitesses supérieures à $2^\circ\text{C}/\text{mn}$ seront utilisées pour des cellules de plus petite taille comme les spermatozoïdes.

d) Le refroidissement en phase solide = Pente R3

Sans être délétère pour l'échantillon, la déshydratation des cellules s'arrête à -35° , -40°C , température à laquelle la membrane cellulaire devient imperméable (Karlsson and Toner 1996). La descente thermique est accélérée de 10 à $50^\circ\text{C}/\text{mn}$ jusqu'à -150°C . A une température inférieure à -103°C , la structure cristalline est stable. Donc à -150°C , les échantillons peuvent être directement plongés dans l'azote liquide. Il ne faut pas remonter au-dessus de -103°C lors du passage des échantillons congelés du congélateur à l'azote liquide

afin d'éviter les phénomènes de recristallisation de la glace qui entraînent des altérations cellulaires.

2. La congélation ultra rapide ou vitrification

La vitesse théorique de vitrification sans cryoprotecteur est impossible à atteindre. En pratique, la technique nécessite l'utilisation d'une association de cryoprotecteurs à hautes concentrations pour obtenir une viscosité importante des milieux extracellulaire et intracellulaire afin de réduire au maximum le temps entre le point de fusion et la température de nucléation. Ceci évite la formation de cristaux de glace lors de la plongée dans l'azote liquide et réalise un état vitreux (vitrification). La vitesse de refroidissement doit être très rapide (de l'ordre de 300°C/minute) (Pegg 2002). Les concentrations élevées de cryoprotecteurs sont atteintes par application de solutions de concentrations progressivement croissantes (Fahy *et al.* 2004). Un des problèmes soulevé par cette technique est celui de la toxicité de ces solutions de cryoprotecteurs, d'autant plus importante que les concentrations utilisées sont élevées. La cinétique de refroidissement est très brève : après un équilibre dans les mélanges de cryoprotecteurs, les cellules conditionnées dans des paillettes, sont plongées directement dans l'azote liquide à -196 °C. Il n'y a pas de formation de cristaux de glace à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules. L'étape la plus délicate de cette méthode est celle du réchauffement au cours duquel existe un risque de formation de cristaux de glace. Le succès est fonction des types d'agents cryoprotecteurs utilisés, de la méthode d'addition et de dilution, et de la durée d'exposition avant le refroidissement. Le refroidissement et le réchauffement doivent être rapides pour éviter une dévitrification extensive et une cristallisation (Rall *et al.* 1987). Un autre problème pouvant se rencontrer au cours du réchauffement est la survenue de fractures de par la fragilité du verre formé, sensible aux chocs ou aux gradients thermiques trop importants. Les molécules sont figées dans une

position créant des contraintes dans l'échantillon vitrifié, le rendant très cassant (Pegg *et al.* 1997).

La première congélation par vitrification d'embryons de souris a été rapportée par Rall et Fahy, en 1985 (Rall and Fahy 1985), en utilisant une solution contenant quatre cryoprotecteurs : diméthylsulfoxyde (DMSO), acétamide, propylène glycol (PROH) et polyéthylène glycol. Cette solution a été appelée VS1 et a été utilisée par d'autres auteurs pour la congélation d'ovaires de rats (Sugimoto *et al.* 2000) et d'ovaires humains (Isachenko *et al.* 2003) D'autres mélanges de cryoprotecteurs ont donné des résultats encourageants sur le plan histologique, notamment avec l'utilisation de la solution VS4 pour vitrifier des reins de lapins (Isachenko *et al.* 2003). Cette solution contient trois cryoprotecteurs : DMSO, formamide et PROH. C'est le VS1 et VS4 qui ont servi de base pour les travaux de notre équipe sur la vitrification (Courbiere *et al.* 2006).

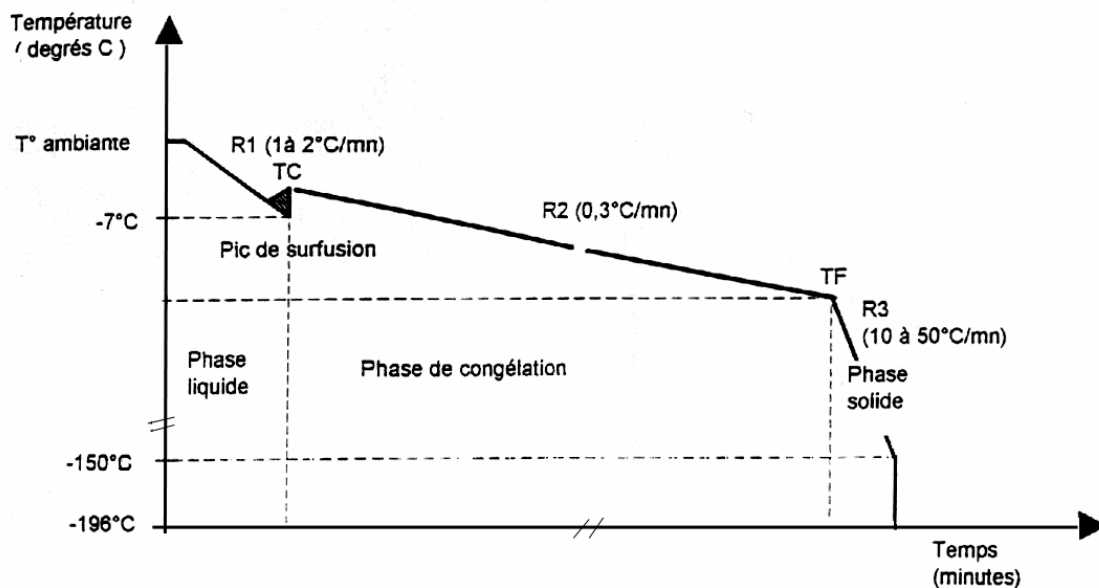


Figure 14 : différentes étapes de la congélation lente. (Lornage 1995).

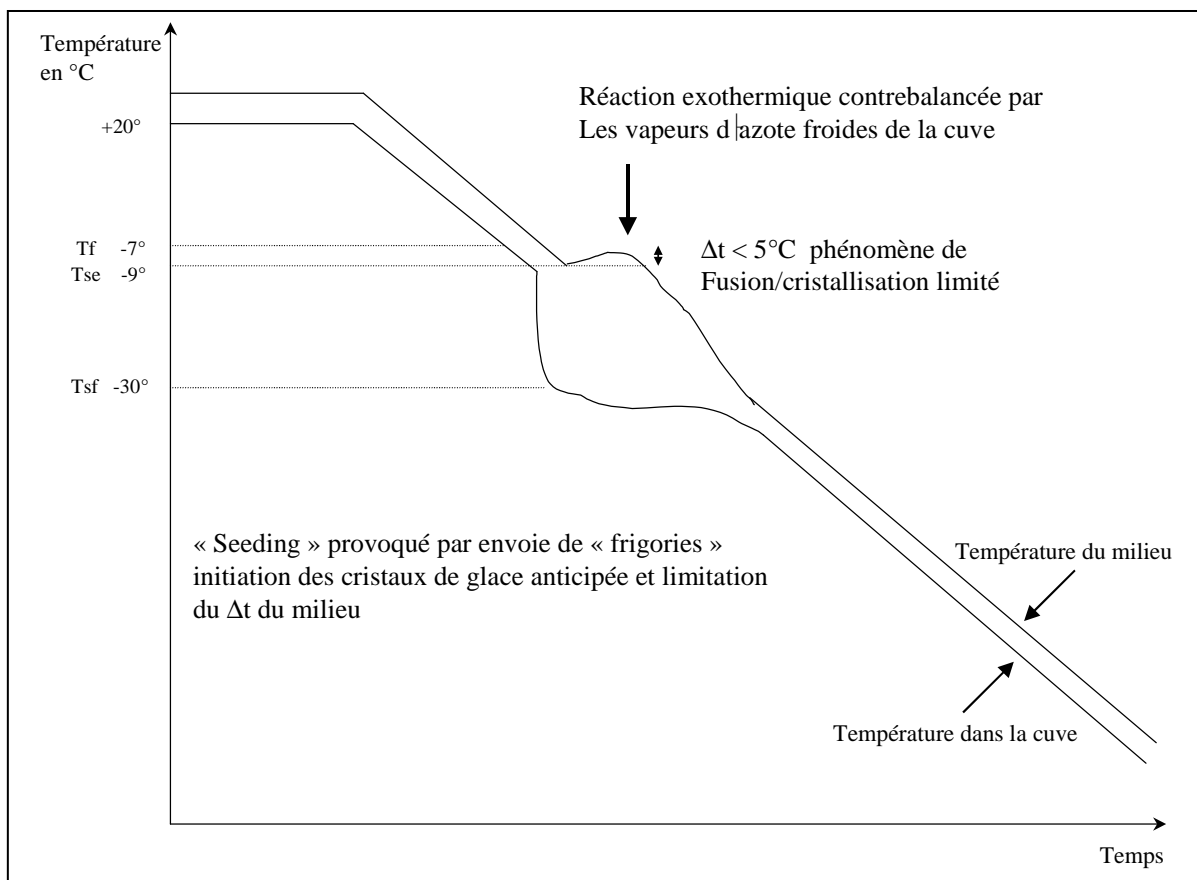
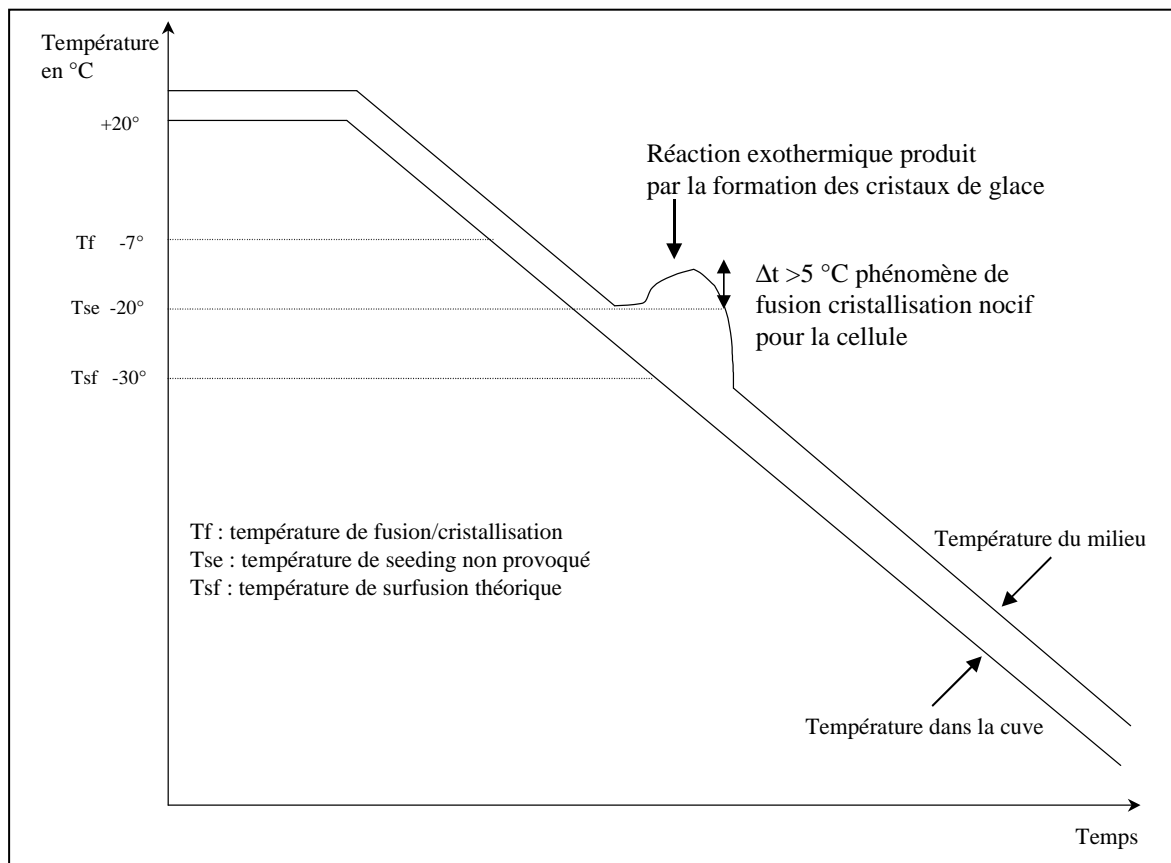


Figure 15: phase de congélation sans et avec seeding provoqué.

D. Vitesse de décongélation après congélation lente

Comme lors de la congélation, les points critiques (point de fusion, surfusion, transition de l'état vitreux) seront traversés à nouveau par l'échantillon en sens « inverse », la nucléation et la croissance des cristaux peuvent se produire à nouveau (Karlsson and Toner 1996). Afin d'éviter ces phénomènes, la vitesse de décongélation est calculée en fonction de l'état de déshydratation cellulaire lié à la taille des cellules et aux vitesses de congélation. Pour la plupart des protocoles une vitesse rapide de décongélation d'environ $25^{\circ}\text{C}\cdot\text{sec}^{-1}$ jusqu'à la température ambiante est utilisée.

E. Congélation du tissu

Les cellules isolées comme les ovocytes ou les structures de quelques cellules comme les embryons permettent d'établir des modèles de congélation. Les recherches portant sur la congélation de tissu s'appuient sur des modèles cellulaires physicochimiques plus ou moins connus, mais compte tenu de la difficulté de modélisation, la plupart des études ont tiré des informations d'évaluations empiriques (Pegg 2002). Des notions de diffusions massiques et thermiques permettent d'expliquer certains problèmes rencontrés par la congélation du tissu. Pour la diffusion massique, des modèles de transport de masse, en particulier de l'eau dans les tissus au cours de la congélation, ont montré que les cellules internes se déshydratent plus lentement que les cellules en surface, notamment dans les tissus riches en cellules. Le transport des cryoprotecteurs dépend de la composition et de la géométrie du tissu, et peut varier de quelques minutes à quelques heures. Pour atteindre la concentration minimale à l'intérieur du tissu, les cellules en surface pourront être exposées à des concentrations toxiques. Pour la diffusion thermique, les modèles de transport de chaleur dans un tissu ont montré qu'au cours du refroidissement, les pertes de chaleur ne sont pas réparties uniformément et des gradients thermiques s'établissent de la surface vers l'intérieur du tissu.

Malgré l'élargissement des connaissances sur la cryobiologie, la modélisation théorique de la cryoconservation de tissu ovarien est actuellement impossible, elle nécessite des études sur des modèles empiriques.

IV. Intérêts et indications de l'autoconservation ovarienne en médecine humaine

En France, selon les données du rapport de la commission d'orientation du cancer 2003 (FRANCIM, 2000), pour l'année 2000, 278 253 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués : 161 025 chez l'homme et 117 228 chez la femme. En 1980 l'incidence n'était que de 170 228 cas pour les deux sexes, soit une augmentation de 61% liée au vieillissement de la population mais également à une augmentation du risque de cancer estimé à plus de 35%. Sur l'ensemble des cancers féminins, 3,9% touchent des femmes de moins de 34 ans soit 4560 cas. Le nombre de décès par cancer était estimé à 57 734 chez la femme dont 610 chez les moins de 34 ans (FRANCIM, 2000).

L'intensification thérapeutique a permis une amélioration notable de la survie permettant aux jeunes femmes d'élaborer des projets d'avenir et d'exprimer des désirs d'enfants, mais une forte proportion de ces femmes devient stérile après traitement.

En Rhône-Alpes, sur les 5,6 millions habitants que compte la région, le réseau FRANCIM estime pour les femmes, à environ une centaine de nouveaux cas de cancer par an pour la classe d'âge [0-19 ans] et environ 400 nouveaux cas pour la classe d'âge [20-34 ans]. Pour la classe d'âge [20-34 ans], une population de 500 femmes et jeunes filles est susceptible d'avoir recours à une autoconservation ovarienne Figure 17. Ce chiffre est à minorer, certains cancers relevant uniquement d'un geste chirurgical isolé (mélanome).

Cancer in children	Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma Leukemia Ewing's sarcoma Wilms' tumor Neuroblastoma Pelvic osteosarcoma Genital rhabdomyosarcoma
Breast cancer	Infiltrative ductal histological subtype Infiltrative lobular? Stage I-III Stage IV?
Cancer of the cervix	Squamous cell carcinoma Adeno/adenosquamous carcinoma?
Autoimmune and hematological diseases	Systemic lupus erythematosus Behcet's disease Steroid resistant glomerulonephritis Inflammatory bowel disease Pemphigus vulgaris Rheumatoid arthritis Progressive systemic sclerosis Juvenile idiopathic arthritis Multiple sclerosis Autoimmune thrombocytopenia Aplastic anemia Sickle cell disease
Benign ovarian disease	Endometriosis Benign ovarian lesions requiring repeated surgeries
Patients receiving pelvic radiation	Solid organ tumors presenting in the pelvis Ewing's sarcoma Osteosarcoma Tumors of the spinal cord Retroperitoneal sarcoma Rectal cancer Benign bone tumors
Prophylactic oophorectomy	BRCA-I-positive patients BRCA-II-positive patients?
Hematopoietic stem cell transplantation	Malignant diseases Genetic, hematological, and autoimmune disorders

Figure 17 : Indications d'autoconservation ovarienne (Sonmezer and Oktay 2006)

A. Action des traitements anticancéreux sur la fonction gonadique

Les effets des traitements sont basés sur des arguments cliniques : irrégularités menstruelles, aménorrhées, signes d'hypoestrogénie (bouffées de chaleur, baisse de la libido,

sècheresse vaginale...), et chez la jeune fille pré-pubère, absence ou arrêt de la puberté. Des examens paracliniques, à type d'échographie ovarienne, de dosages biologiques (FSH, LH, estradiol, inhibine B, AMH, progestérone...) sont associés pour étayer le diagnostic d'insuffisance ovarienne. Compte tenu de son caractère invasif, l'étude histologique ovarienne n'est réalisée que dans le cadre de protocoles de recherche définis.

L'information concernant l'état de capital ovarien repose essentiellement, dans les études, sur les signes cliniques, ne renseignant pas sur le capital folliculaire réel restant. Selon un modèle mathématique établi par Faddy et al (Faddy *et al.* 1992), une perte de 90% des follicules de réserve à l'âge de 14 ans, provoquerait une ménopause précoce à l'âge de 27 ans.

Une reprise des cycles après traitement n'est donc pas synonyme de respect de l'intégrité de la réserve folliculaire ovarienne. Par exemple, l'administration de 75g.kg⁻¹ de cyclophosphamide chez la souris entraîne la perte de la moitié du capital folliculaire par apoptose, mais n'influence en rien à court terme la performance reproductive comme l'ovulation ou le taux de grossesse (Meirow *et al.* 1999). Différents travaux décrivent qu'une reprise de cycles chez les femmes ayant subi des traitements anti-cancéreux, est accompagnée d'un risque important de ménopause précoce (Byrne *et al.* 1992; Wallace *et al.* 1993).

B. Radiothérapie

Le premier article faisant référence aux effets de la radiothérapie sur la fonction ovarienne remonte à 1939 : une dose de 5 Gy provoquait chez les femmes de plus de 40 ans une ménopause définitive dans les 6 à 18 mois suivant l'irradiation (Jacox 1939).

Les effets de la radiothérapie sur la fertilité sont dépendants de différents facteurs :

- Le champ d'irradiation
- La dose administrée
- L'âge de la patiente
- Le fractionnement de la dose

L'effet de la radiothérapie sur la fonction ovarienne varie logiquement selon le champ d'irradiation, les irradiations pelviennes et abdominales mettant les ovaires directement en contact avec les rayons. Ces résultats ont été confirmés par différentes études, notamment en 1987 Hamre *et al.* ont suivi sur une période de 5 ans, 97 jeunes filles traitées pour leucémie aigue lymphoïde (LAL). Toutes les jeunes filles ont été traitées par radiothérapie, la seule variable permettant de définir trois groupes distincts était liée au champ d'irradiation : le premier groupe a subi une irradiation abdominale, le deuxième une irradiation cranio-spinale, et le troisième une irradiation crânienne. Un arrêt ou une absence de puberté associé à une FSH élevée ont été observés chez 93 % des filles traitées par irradiation abdominale, chez 40% des filles ayant reçu une irradiation cranio-spinale, et chez 9% des filles ayant reçu uniquement une irradiation crânienne (Hamre *et al.* 1987). L'action directe des rayons sur le tissu ovarien semble essentielle dans le mécanisme de la gonadotoxicité.

Dès les années 70, les doses d'irradiation responsables de stérilité définitive ont été déterminées. Quel que soit l'âge de la patiente, une dose de 20 Gy a été démontrée suffisante pour provoquer une stérilité définitive. Après l'âge de 40 ans, cette même dose n'est plus que de 6 Gy (Lushbaugh and Casarett 1976). Quelques années auparavant, de simples doses de 2,5 à 5 Gy ont montré qu'elles pouvaient entraîner des irrégularités menstruelles, avec des atteintes gonadiques variables selon les classes d'âge : entre 15 et 40 ans, 60 % de stérilité définitive ont été observées vs 100% pour la classe d'âge supérieure à 40 ans (Baker *et al.* 1972). Ces différentes études montraient dès les années 70 les rôles joués par la dose d'irradiation reçue et l'âge de début de traitement. Ces variations d'atteintes gonadiques sont sans nul doute liées à une réserve ovarienne folliculaire plus faible chez la femme de plus de 40 ans plutôt qu'à une moindre résistance du tissu ovarien à la radiothérapie. En 1989, Wallace *et al.*, ont déterminé la LD 50 correspondant à la dose de radiation détruisant 50% de la réserve folliculaire. La LD50 a été estimée à 4 Gy aussi bien pour la jeune fille pré-pubère que pour la femme adulte (Wallace *et al.* 1989). À partir de nouvelles données et d'un modèle

mathématique amélioré, cette dose a été corrigée à < 2 Gy (Wallace *et al.* 2003). Ces modèles mathématiques permettent de prédire, pour un âge donné et selon les doses cumulées reçues, l'âge de survenue de la stérilité (Wallace *et al.* 2005).

A un degré moindre, le fractionnement de la dose semble également jouer un rôle dans l'atteinte gonadique. Thibaud *et al.* ont observé qu'une irradiation corporelle totale ICT ≤ 10 Gy en une seule dose avant la puberté causait une insuffisance ovarienne chez les jeunes filles. Avec des doses fractionnées, permettant des phases de repos, cet effet serait moins marqué, même avec des doses plus importantes (Thibaud *et al.* 1998).

La gonadotoxicité de la radiothérapie est supérieure à celle de la chimiothérapie (Maltaris *et al.* 2007). Les deux traitements souvent associés (notamment avant autogreffe et allogreffe de moelle osseuse) agissent en synergie dans leur action anti-cancéreuse, mais également sur la perte folliculaire ovarienne. Byrne *et al.* ont étudié l'effet de la chimiothérapie, de l'association chimiothérapie et radiothérapie et de la chirurgie isolée, dans une étude prospective. A partir de patientes atteintes de lymphome malin hodgkinien (LMH) âgées de 13 à 19 ans, trois groupes de jeunes femmes ont été établis. Parmi, ces trois groupes, 7 ans après le début de traitement, le risque de survenue de ménopause précoce, par rapport aux jeunes filles traitées par un acte chirurgical isolé est multiplié par 9,1 si la jeune femme a été traitée par des agents alkylants, et par 27,7 si la jeune fille a été traitée par des agents alkylants associés à la radiothérapie (Byrne *et al.* 1992).

Les agents de chimiothérapie même employés seuls sont responsables d'un nombre important de stérilité définitive, le degré d'atteinte de la fonction gonadique étant fortement dépendant de la nature du produit utilisé (Sonmezer and Oktay 2006).

C. Chimiothérapie

Les agents chimiothérapeutiques peuvent être divisés en différentes classes thérapeutiques selon leur mode d'action. Les principales classes sont:

- Les alkylants induisant des modifications covalentes de l'ADN et inhibant la synthèse de l'ADN : chlorambucil, melphalan, cyclophosphamide, carboplatine, cisplatine, procarbazine, busulfan...
- Les antimétabolites interagissant avec la biosynthèse de l'ADN : méthotrexate, 5-fluorouracile, cytarabine, fludarabine, hydroxycarbamide...
- Les agents intercalants induisant ou stabilisant des coupures de l'ADN, avec la classe des anthracyclines : épirubicine, adriamycine...
- Les agents scindants agissant par fragmentation de l'ADN, dont la bléomycine.
- Les poisons du fuseau bloquant les cellules en métaphase : vincristine, vinblastine...
- Les épipodophyllotoxines inhibant la topoisomérase II, enzyme impliquée dans la torsion et détorsion de la double hélice d'ADN, avec l'etoposide ou VP16 ..
- autres cytotoxiques : asparginase...
- autres thérapeutiques: cytokines, hormonothérapie, immunothérapie, anticorps monoclonaux.

L'insuffisance ovarienne consécutive au traitement par chimiothérapie a été observée pour la première fois dans les années 50. Trois équipes indépendantes ont observé des ménopauses précoces chez les femmes traitées par Busulfan pour leucémie myeloïde chronique (LMC) (Louis *et al.* 1956). Les années suivantes des faibles doses de cyclophosphamide utilisées dans le cadre de polyarthrites rhumatoïdes (PR) et de Lupus Erythémateux Disséminés (LED) ont entraîné des aménorrhées définitives chez un grand nombre de patientes (Fosdick *et al.* 1968).

Les effets observés dépendent des facteurs suivants :

- Le produit utilisé
- La dose administrée
- L'âge de la patiente

Les produits administrés n'ont pas tous la même action gonadotoxique. La classe des agents alkylants étant identifiée depuis longtemps comme la plus toxique pour la fonction

ovarienne. Dès 1980, parmi deux groupes de patientes, l'un traité par des agents alkylants dans un contexte de Lymphome Malin Hodgkinien (LMH), et l'autre par l'association anthracycline et anti-métabolites dans un contexte de leucémie aigue, les risques d'altération de la fonction gonadique sont différents (Wang *et al.*). Dans le premier groupe, une élévation de FSH a été retrouvée pour 4 patientes sur 7 alors que dans le deuxième groupe aucune élévation de FSH n'a été observée pour l'ensemble des 8 patientes (Wang *et al.* 1980).

La dose de produit reçue est aussi un facteur important à prendre en compte. Mok *et al.*, ont déterminé dans le cadre de Lupus Erythémateux Disséminé (LED), qu'une dose cumulée de 5,2 g de cyclophosphamide provoque chez les femmes de plus de 40 ans une ménopause définitive (Mok *et al.* 1998).

Comme pour la radiothérapie, l'âge de la patiente est un élément pronostic important à prendre en compte.

Chez 44 femmes (âge moyen 23 ans) préalablement traitées par chimiothérapie MVPP (moutarde azotée, vinblastine, procarbazine et prednisone) dans le cadre de Lymphome Malin Hodgkinien (LMH), 17 jeunes femmes ont maintenu des cycles réguliers (âge moyen 22 ans), 10 d'entre elles ont développé des oligoménorrhées (âge moyen 23 ans) et 17 femmes plus âgées (âge moyen 30 ans) ont développé une aménorrhée qui a débuté au milieu du traitement (Whitehead *et al.* 1982).

Dans le cadre de cancer du sein, le même traitement associant la cyclophosphamide, le busulphan et le melphalan, a été administré à différentes classes d'âges : seulement 22% des femmes âgées de moins de 40 ans sont devenues ménopausées alors que ce taux a atteint 73 % pour les femmes âgées de plus de 40 ans (Fisher *et al.* 1979). Ces différents résultats confirment la corrélation positive entre le degré d'atteinte gonadique et l'âge de la patiente.

Une étude portant sur un grand nombre de patientes (168 femmes atteintes de différents types de cancers et traitées par des chimiothérapies conventionnelles) a permis d'évaluer le risque d'insuffisance ovarienne en fonction du produit utilisé, et de la pathologie. Parmi ces

168 femmes, 47 étaient atteintes de Leucémie Aigue Myéloïde (LAM), 36 de Lymphome Malin Non Hodgkinien (LMNH), 47 de Lymphome Malin Hodgkinien (LMH), et 38 de cancer de sein. Pour l'ensemble des 168 patientes, 34 % d'insuffisances ovariennes ont été retrouvées. Le taux d'insuffisance ovarienne a été de 15% pour la LAM, 32% pour le LMH, 44% pour le LMNH et 50% pour le cancer du sein (Figure 18) (Meirow 1999). L'implication de différentes classes thérapeutiques dans l'insuffisance ovarienne a été analysée par odd ratio (OR). Un OR de 3,98 a été retrouvé pour les agents alkylants, un OR de 1,77 pour le cisplatine, un OR de 1,15 pour les alkaloïdes, et un OR < 0,5 pour les antimétabolites. Ces chiffres confirment que les agents alkylants sont les agents chimiothérapeutiques les plus gonadotoxiques (Figure 19 et 20) (Meirow 1999; Meirow and Nugent 2001) (Sonmezer and Oktay 2004; Sonmezer and Oktay 2006)

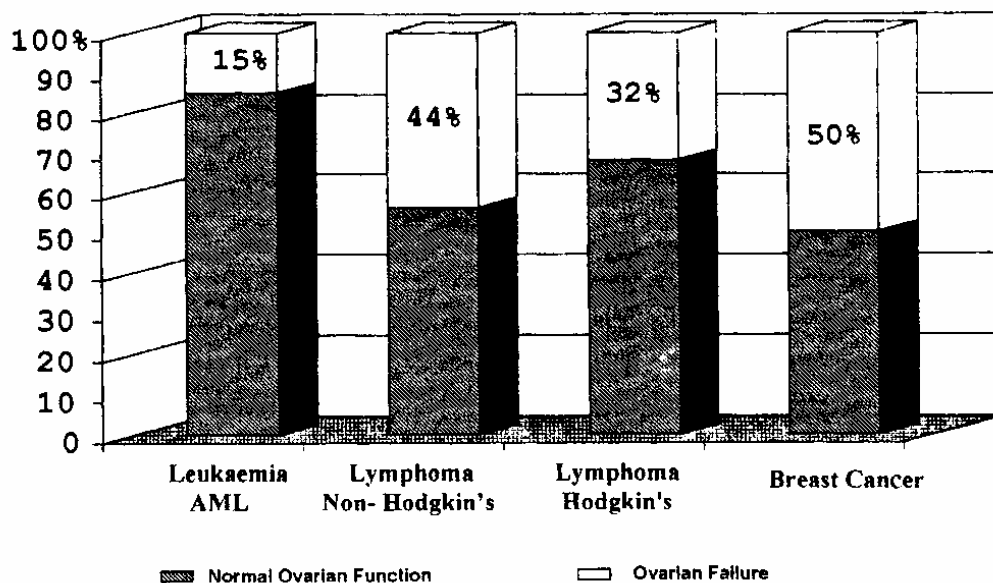


Figure 18 : Taux d'insuffisance ovarienne selon le type de cancer (Meirow 1999)

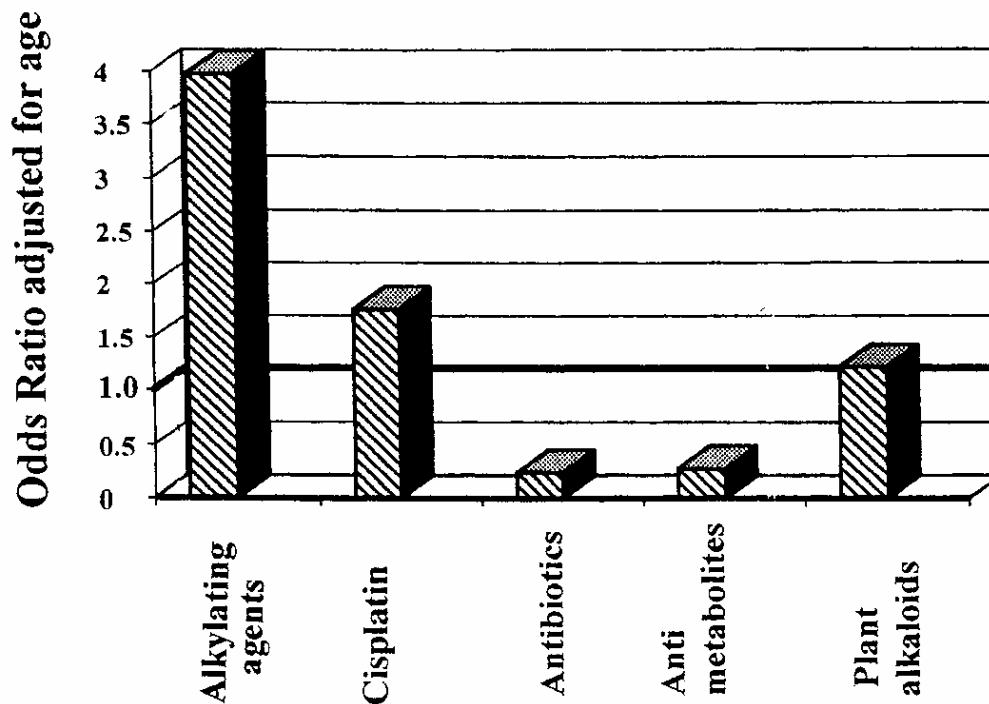


Figure 19 : Odds Ratios d'insuffisance ovarienne selon l'agent chimiothérapique (Meirow 1999)

High risk

Cyclophosphamide
 Melphalan
 Busulfan
 Nitrogen mustard
 Cholarambucil
 Procarbazine

Intermediate risk

Cisplatin
 Adriamycin
 Paclitaxel^a

Low or no risk

Methotrexate
 5-Fluorouracil
 Vincristine
 Bleomycin
 Actinomycin D

^aConfirmation needed.

Figure 20: Degré d'atteinte gonadique selon l'agent de chimiothérapie utilisé. (Sonmezer and Oktay 2006)

D. Mécanismes gonadotoxiques des traitements anticancéreux

1. Effets centraux

La radiothérapie, en particulier l'ICT (irradiation corporelle totale) semble jouer un faible rôle sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Des irradiations cérébrales avec des doses massives (30 Gy) sur l'hypophyse sont nécessaires pour entraîner un trouble de sécrétion des gonadotrophines (Constine *et al.* 1993).

2. Effets sur le tissu ovarien

L'effet des traitements anticancéreux sur la masse tumorale repose sur des mécanismes d'action variés. Les plus anciennement connus passent par l'arrêt de la prolifération tumorale et par l'induction de la mort mitotique : les agents anti-cancéreux interfèrent dans le cycle cellulaire et induisent une instabilité génomique. Un autre mécanisme est décrit depuis quelques années et concerne l'induction de l'apoptose (Verheij and Bartelink 2000; Solary *et al.* 2001; Sonmezer and Oktay 2006).

Contrairement aux tissus à activité mitotique intense (les spermatogonies, les entérocytes, les cellules souches hématopoïétiques), le stock de follicules ovariens est établi dès la vie fœtale et ne se renouvelle pas, il subit une atresie majeure au cours de la période d'activité génitale de la femme. Physiologiquement, la majorité des follicules primordiaux entreront en apoptose avant d'avoir pu débiter leur croissance (Gougeon 1986). Ce phénomène semble expliquer la sensibilité des follicules ovariens aux traitements anticancéreux par un mécanisme pro-apoptotique (Tilly and Kolesnick 2003).

In vivo, après chimio ou radio thérapie, les lésions sont similaires au niveau histologique, les ovocytes subissent une condensation de la chromatine et deviennent pycnotiques, ce phénomène est suivi de la destruction de la membrane plasmique. Le tissu est ensuite remplacé par une cicatrice fibreuse atrophique (Himmelstein-Braw *et al.* 1978; Familiari *et al.* 1993).

Toujours *in vivo*, l'effet direct des radiations sur des ovaires de souris a montré que des doses de 0,1 ; 0,2 ; 0,3 Gy réduisaient le taux de follicules primordiaux de façon dose dépendante (Gosden *et al.* 1997).

Dans une autre étude *in vitro* réalisée sur des fragments de cortex ovarien de souris, l'exposition à des doses thérapeutiques de cisplatine a montré une destruction de l'architecture des follicules, une disparition de l'ovocyte. Perez *et al.* ont montré que des ovocytes de souris exposés *in vitro* à des doses croissantes de doxorubicine entraînaient une apoptose ovocytaire (Perez *et al.* 1997).

Depuis ces dernières années, de nombreux mécanismes intracellulaires de l'ovocyte concernant l'initiation et l'exécution de l'apoptose dans diverses situations physiologiques et pathologiques ont pu être étudiés. L'induction apoptotique post chimio et radiothérapeutique ne passerait pas par la voie de la protéine p53, mais les membres de la famille caspase seraient impliqués. Ces résultats ont pu être obtenus à partir de l'étude de souris (KO) déficientes en gènes de protéines impliquées dans les voies d'apoptose (Pru and Tilly 2001).

A partir de différents signaux et en particulier des signaux de stress, la sphingomyelinase (ASMase) va produire la céramide, second messager sphingolipidique qui possède une action proapoptotique. Cette céramide est métabolisée et phosphorylée en Sphingosine 1 Phosphate (S1P) qui possède une action antagoniste anti-apoptotique (Morita *et al.* 2000). La réserve folliculaire ovarienne de souris déficientes en sphingomyelinase (ASMase) est deux fois plus importante à la naissance que la réserve folliculaire de souris sauvages. *In vitro*, il a été montré au cours d'une autre étude, une survie supérieure de tissu ovarien mis en culture issu de souris déficientes en ASMase par rapport à du tissu ovarien issu de souris sauvages. Ces mêmes résultats ont été retrouvés au cours d'une culture ovarienne issue de souris sauvages dont le milieu a été supplémenté en Sphingosine 1 Phosphate, métabolite et antagoniste de la céramide (Morita *et al.* 2000). Ces différents travaux montrent le

rôle possible de la voie de la sphingomyeline dans la voie d'apoptose induite par les traitements anticancéreux.

V. Cinq différentes stratégies pour préserver la fonction gonadique

Le maintien de la fonction ovarienne peut s'envisager sous divers aspects.

A. Au cours de la Radiothérapie

- Par l'utilisation de bouclier protégeant l'ovaire
- Par ovariopexie ou transposition ovarienne (Leporrier *et al.* 1987), chirurgie qui consiste à déplacer l'ovaire de son emplacement anatomique et de le placer à distance du rayonnement. La transposition ovarienne peut se réaliser par laparotomie ou par coelioscopie. Ainsi dans le cadre de Lymphome Malin Hodgkinien, la dose reçue par l'ovaire durant l'irradiation peut être réduite de 44 Gy à 0,55 Gy (Ortin *et al.* 1990).

Ces méthodes ne permettent pas une protection absolue contre les effets de l'irradiation (Maltaris *et al.* 2007).

B. Au cours de la Chimiothérapie

Pour une même pathologie, l'utilisation de différents protocoles de chimiothérapie de même efficacité thérapeutique peuvent se discuter selon leur gonadotoxicité (Del Mastro *et al.* 2006). Dans les années 80, le traitement ABVD dans le LMH était déjà reconnu moins toxique pour la fonction gonadique que le protocoles MOPP ou MVPP (Viviani *et al.* 1985) (Figure 21).

Regimen (Ref.)	% patients developing amenorrhea
CMF × 6 cycles (19)	20–75
CEF × 6 (20,21)	50–60
AC × 4 cycles (19)	34
MF × 6 cycles (19)	9
FAC × 6 cycles (22)	51
TAC × 6 cycles (22)	61
AC × 4 cycles followed by a taxane (23)	15*

* Only patients ≤40 year old were analyzed.

Figure 21 : Incidence des ménopauses selon le protocole de CT utilisé (Del Mastro *et al.* 2006).

C. Au cours de radio et/ou chimiothérapie

En dehors des mesures précédentes qui concernent précisément la radiothérapie, ou la chimiothérapie, les mesures suivantes sont des mesures générales qui peuvent s'appliquer pour les deux types de traitements.

Il est possible d'ajouter au traitement anticancéreux des traitements adjuvants protecteurs.

Une des hypothèses est liée à une toxicité moindre des traitements anti-cancéreux sur la fonction gonadique si les gonades sont mises « au repos ». Ataya et al en 1995 ont utilisé chez le singe rhésus des agonistes de GnRH dont le rôle était de bloquer la voie centrale hypothalamo-hypophysaire et ainsi bloquer la fonction gonadique. Ils ont observé un effet protecteur des agonistes en association à la chimiothérapie (Ataya *et al.* 1995), non retrouvé en association à la radiothérapie (Ataya *et al.* 1995). Partant de ces travaux Blumenfeld *et al.* en 1996 les ont appliqués. Des patientes ont reçu des agonistes de GnRH associés à la chimiothérapie : 1 femme sur 28 (3,6%) a présenté une insuffisance ovarienne contre 26 sur 40 (65%) traitées par chimiothérapie seule. Ces résultats ont été retrouvés en 2005, sur les femmes traitées par chimiothérapie et agonistes de GnRH : 5/75 soit 6,7% des femmes ont présenté une insuffisance ovarienne précoce contre 53,7% dans le groupe témoin (44/82 femmes) (Blumenfeld and Eckman 2005). D'autres résultats expérimentaux ont montré une protection efficace de la réserve ovarienne contre les effets de la chimiothérapie par des

antagonistes de GNRH chez la souris (Meirow *et al.* 2004). Ces résultats de la protection ovarienne contre la chimiothérapie par blocage de la fonction gonadique n'ont pas été retrouvés par l'ensemble des essais cliniques (Waxman *et al.* 1987; Meirow 2000; Giuseppe *et al.* 2007). Actuellement, l'efficacité de ces traitements reste controversée (Maltaris *et al.* 2007).

L'implication de la voie d'apoptose dans le traitement anticancéreux a permis d'utiliser de nouveaux traitements adjuvants dans différents essais expérimentaux, comme la Sphingosine 1 phosphate S1P, antagoniste de la céramide (Sonmezer and Oktay 2006).

La S1P en injection dans la bourse ovarienne chez la souris, avant irradiation de 0,1 Gy diminue de façon dose dépendante la perte folliculaire (Morita *et al.* 2000). Après 1 an, 75% des souris sont restées fertiles contre seulement 12,5% des souris témoins (Paris *et al.* 2002).

Un des inconvénients majeurs du traitement par la S1P est le risque d'atteinte du système nerveux central des nouveaux nés dont les mères ont été traitées par S1P (sous forme de maladies de surcharge : syndrome de Niemann Pick).

D'autres options sont possibles pour maintenir la fonction ovarienne. Ces possibilités sont dépendantes de la maturation sexuelle de la patiente et de sa situation conjugale au moment de la prise en charge.

D. Congélation d'embryons et/ou d'ovocytes mûrs

Ce sont les seuls moyens actuellement disponibles, qui permettent de conserver efficacement la fertilité et sont proposés avant tout traitement anticancéreux. A chaque stimulation folliculaire, une dizaine d'ovocytes est récupérée en moyenne, ce qui limite le nombre d'embryons et d'ovocytes potentiellement congelables. En 1994, le rendement pour les embryons congelés était de 11% de naissances à terme par cycle (Atkinson *et al.* 1994). En France entre 2002 et 2004 pour une moyenne d'environ 10 000 transferts d'embryons congelés par an, ce chiffre selon l'agence de la BioMédecine se situe autour de 12%. Pour les

ovocytes mûrs le taux de naissance par ovocyte décongelé est passé de 1% (Porcu *et al.* 1997) à environ 4 % (Porcu and Venturoli 2006). Malgré cette amélioration, ces résultats limitent encore l'utilisation de cette dernière méthode.

Par ailleurs ces méthodes nécessitent un cycle de stimulation qui n'est pas toujours possible quand les traitements anticancéreux doivent être entrepris le plus rapidement possible.

E. Congélation ovarienne

1. Congélation de follicules immatures

Une autre possibilité est d'isoler du cortex, soit l'ovocyte associé à son cumulus oophorus (COCs : cumulus oocyte complex) (Newton *et al.* 1999) soit le follicule ovarien entier isolé du cortex (Carroll and Gosden 1993). Ces techniques concernent des follicules déjà en phase de croissance, difficiles à extraire chez l'humain, en faible quantité et peu résistants à la congélation.

2. Congélation du tissu ovarien

Actuellement la seule option qui permette de préserver la fertilité des jeunes filles pré pubères et des jeunes femmes sans partenaire est la conservation de cortex ovarien. Les follicules primordiaux, du fait de leur petit volume, sont résistants à la congélation, ils représentent de plus le contingent majoritaire (95%) des follicules du tissu ovarien. Cette congélation est maintenant réalisée dans de nombreux pays en routine comme l'attestent les revues internationales (Sonmezer and Oktay 2004; Donnez *et al.* 2006). Mais aucun consensus n'existe quant aux protocoles de congélation à adopter (Figure 22 et Figure 23).

Des travaux récents suggèrent d'associer à la congélation du tissu ovarien la ponction de follicules antraux de l'ovaire après son exérèse, la maturation *in vitro* des ovocytes récupérés et la vitrification des ovocytes en métaphase II (Huang *et al.* 2007).

Figure 22 : Cryoconservation de cortex ovarien humain. Principaux protocoles utilisés dans les cas d'autogreffe de cortex ovarien. D'après Schubert 2007

Référence	CPA / Milieu de base	Protéine	Temps d'équilibration	Température de début de congélation	Seeding	Pente de refroidissement
Oktay et Karlikaya (2000) d'après Oktay <i>et al.</i> (1998)	PROH (1,5M) dans Leibovitz	Sérum de la patiente (5-10%)	30 minutes sur glace	0°C	manuel à -7°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 10°C/min
Radford <i>et al.</i> (2001)	PROH (1,5M) dans Leibovitz	HSA (2,5%)	30 minutes à 4°C	0°C	« induit » à -9°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 10°C/min
Callejo <i>et al.</i> (2001)	DMSO (1,5M) dans RPMI	Sérum Humain (20%) (Irvine)	10' à 4°C dans une solution à 0,7M de DMSO	4°C	automatique à -7°C	A: 0,5°C/min B: 0,5°C/min C: 5°C/min D: 8°C/min
Kim <i>et al.</i> (2004)	DMSO (1,5M) Sucrose (0,1M) dans Leibovitz	HSA (1%)	30 minutes à 4°C	np	manuel à -7°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 10°C/min
Oktay <i>et al.</i> (2004) d'après Schnorr <i>et al.</i> (2002)	DMSO (1,5M) dans milieu M2	Sérum de la patiente (10%)	15 minutes sur glace	np	manuel à -7°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 10°C/min
Donnez <i>et al.</i> (2004)	DMSO (1,5M) dans Leibovitz	HSA (4mg/ml)	np	0°C	manuel à -8°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 30°C/mn

Meirow <i>et al.</i> (2005)	np	np	np	np	np	np
Schmidt <i>et al.</i> (2005b) d'après Schmidt <i>et al.</i> (2003)	EG (1,5M) Sucrose (0,1M) dans PBS	np	30 minutes à 1°C	np	manuel à -9°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 10°C/min
Wolner-Hanssen <i>et al.</i> (2005)	PROH (1,5M) sucrose (0,1M) dans PBS	np	np	np	automatique	“protocole de congélation lente”
Demeestere <i>et al.</i> (2006)	DMSO (1,5M) sucrose (0,1M) dans Leibovitz	Sérum de la patiente (10%)	30 minutes à 4°C	4°C	manuel à -7°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 10°C/min
Poirot <i>et al.</i> (2006) Piver <i>et al.</i> (2006)	DMSO (1,5M) Sucrose (0,2M) dans Leibovitz	Sérum de la patiente (10%)	30 minutes à 4°C	4°C	manuel à -9°C	A: 2°C/min B: 0,3°C/min C: 10°C/min

Pente de congélation :

A : de la température de départ à la température de seeding

B : de la température de seeding à -40°C ; B' : de la température de seeding à -50°C

C : de -40°C à -120-140°C ; C' : de -50°C à -80°C ; C'' : de -40°C à -150°C

D : de -80°C à -120°C, puis l'échantillon est plongé dans l'azote liquide

Milieux : Leibovitz L-15 (Sigma) ; RPMI 1640 ; M2 (Sigma) ; PBS (Phosphate-buffered saline)

HSA : Sérum albumine humaine

np : non précisé

Figure 23 Protocoles de décongélation du cortex ovarien humain avant autogreffe. np : non précisé. D'après Schubert 2007

Référence	Décongélation	Retrait du/des CPA
Oktay et Karlikaya (2000) d'après Newton <i>et al.</i> (1996)	A température ambiante	Lavages répétés dans milieu de Leibovitz
Radford <i>et al.</i> (2001)	30 secondes à l'air ambiant puis 1 min. dans un bain à 37°C	3 lavages dans 10 ml de milieu de Leibovitz à température ambiante
Callejo <i>et al.</i> (2001)	Dans un bain marie à 37°C	RPMI + 4% HSA (V/V) toutes les min. pendant 7 min.
Kim <i>et al.</i> (2004)	2-3 min. dans un bain marie à 30°C	4 lavages de 3 min. chacun dans le milieu de Leibovitz + : - DMSO (1M) + sucrose (0,1M) - DMSO (0,5M) + sucrose (0,1M) - Sucrose (0,1M) puis milieu de Leibovitz seul
Oktay <i>et al.</i> (2004)	np	np
Donnez <i>et al.</i> (2004)	2 min. à température ambiante puis 2 min dans un bain marie à 37°C	3 lavages successifs dans le milieu de Leibovitz
Meirow <i>et al.</i> (2005)	np	np
Schmidt <i>et al.</i> (2005b) d'après Schmidt <i>et al.</i> (2004)	Rapidement dans un bain marie à 37°C	3 Lavages successifs de 10 min. chacun dans PBS + : - EG (0,75M) + sucrose (0,25M) - sucrose (0,25M) puis PBS seul
Wolner-Hanssen <i>et al.</i> (2005)	30 secondes à température ambiante puis 2 min. dans un bain marie à 37°C	Lavages successifs dans des concentrations décroissantes de CPA dans milieu MEM + sérum de la patiente (20%)
Demeestere <i>et al.</i> (2006)	2 min. à température ambiante puis 2 minutes dans un bain marie à 25°C	Lavages de 5 min. dans le milieu de Leibovitz + : - DMSO (1,5M) - DMSO (1M) - DMSO (0,5M) puis milieu de Leibovitz seul
Poirot <i>et al.</i> (2006) Piver <i>et al.</i> (2006)	np	np

3. Congélation de l'ovaire entier avec son pédicule vasculaire

Cette technique permet, en cas d'autogreffe, d'abaisser le temps de revascularisation du greffon ce qui augmenterait le taux de survie des follicules ovariens. Son inconvénient majeur est lié à la difficulté de congeler un organe entier compte tenu des différents types tissulaires qui le composent. Des résultats encourageants ont été obtenus chez le rat :avec un protocole de congélation lente, une reprise de la fertilité avec une grossesse gémellaire a été observée chez une rate dont l'ovaire avait été congelé avant autogreffe (Wang *et al.* 2002). Chez la brebis avec un protocole de congélation lente, une naissance a été rapportée après autogreffe (Imhof *et al.* 2006). Dans notre équipe, un protocole de congélation d'ovaire entier de brebis par vitrification est en cours de réalisation (Courbiere *et al.* 2005; Courbiere *et al.* 2006). Chez l'humain, Martinez *et al.* ont congelé 3 ovaires entiers humains avec un protocole de congélation lente et n'ont pas retrouvé de signes d'apoptose ou de modifications notables de l'ultrastructure en microscopie électronique (Martinez-Madrid *et al.* 2007).

F. Avenir

Les gamètes artificiels

Dans un futur proche, il est envisageable que la « création » de gamètes artificiels puisse se réaliser. Un ovocyte mûr (ou proche de la maturité) dont le matériel génétique est retiré sera utilisé comme cellule hôte. Il sera ensuite possible de transférer dans cet ovocyte énucléé, le matériel nucléaire d'une cellule somatique issu d'une patiente stérile et d'induire une haploïdisation. (Nagy and Chang 2005). Un gamète artificiel contenant le patrimoine génétique de la patiente sera ainsi créé et pourra être fécondé *in vitro* par un spermatozoïde. Les ovocytes hôtes seront soit issus de dons, soit de la culture de cellules souches embryonnaires. Actuellement des cellules souches embryonnaires murines se sont transformées *in vitro* en gonocytes primordiaux (Payer *et al.* 2006). Ces gonocytes

primordiaux ont pu se différencier en « gamète masculin » et se transformer en cellules « spermiques » fécondantes. Des naissances viables issues de leur fécondation *in vitro* ont pu être obtenus mais des anomalies et des décès prématurés ont été observés (Nayernia *et al.* 2006). Concernant la différenciation en gamète féminin, des ovocytes et des structures ressemblant à des follicules ont pu être également obtenus chez le modèle murin mais sans fécondation (Lacham-Kaplan *et al.* 2006). Chez l'humain, les cultures embryonnaires de cellules souches semblent se différencier en gonocytes primordiaux (Clark and Reijo Pera 2006) mais aucune transformation en gamète féminin n'a pour l'instant été observée. La création de gamètes artificiels se présente comme une alternative à la cryoconservation ovarienne, permettant de préserver la transmission d'une partie du patrimoine génétique de la patiente à sa descendance.

VI. Folliculogénèse *in vitro*

La culture *in vitro* des gamètes féminins est une des voies possibles pour arriver à la maturation finale de l'ovocyte. La plupart des études utilisent les milieux de culture suivant : Waymouth (Eppig and O'Brien 1996) ou α MEM (Cortvrindt *et al.* 1996; Hovatta *et al.* 1997) supplémenté avec 5 à 10% de sérum (Hovatta *et al.* 1997) ou de l'albumine d'origine animale ou humaine (Eppig and O'Brien 1996; Silva *et al.* 2004). Sont ajoutés également de l'insuline (Louhio *et al.* 2000) souvent associée au sélénium et à la transferrine dans l'ITS (Eppig and O'Brien 1996), des antibiotiques et antifongique classiques (penicilline, streptomycine et amphotéricine B), parfois des hormones comme la FSH (Wright *et al.* 1999). La température peut être adaptée à la température corporelle de l'espèce étudiée : 37°C pour la femme (Carlsson *et al.* 2006), de 37° (Mery *et al.* 2006), 38° (Cecconi *et al.* 1999) à 39°C (Muruvi *et al.* 2005) pour la brebis. L'atmosphère est saturée en vapeur d'H₂O avec comme composition gazeuse : 5% de CO₂, 5% d'O₂ (Cecconi *et al.* 1999) à 20% d'O₂ (Hovatta *et al.* 1999),

complété par du N2. Les supports de culture peuvent être adhérent (Hovatta *et al.* 1997), non adhérent (Mery *et al.* 2006), voire un support cellulaire en coculture (Yeoman *et al.* 2005).

Chez la souris le processus complet de folliculogénèse *in vivo* est court (autour d'une vingtaine de jours) (Smitz and Cortvrindt 2002). Après culture *in vitro* en tissu frais, une naissance a été obtenue par Eppig et O'Brien en 1996 et plusieurs naissances basées sur la même technique ont suivi en 2003. Ce processus s'est déroulé en 3 phases distinctes. Une première phase par culture de 8 jours de tissu ovarien a permis la croissance des follicules primordiaux jusqu'au stade de follicules préantraux. La deuxième phase a comporté l'extraction des plus gros follicules préantraux et leur croissance pendant 16 jours jusqu'au stade de follicule antral tardif. Enfin, au bout de 24 jours (8+16jours), des ovocytes au stade de vésicule germinative ont été isolés. Ensuite à une maturation de 17 heures a permis d'obtenir des ovocytes en métaphase II, qui ont été fécondés *in vitro* et ont abouti à la naissance de souriceaux en bonne santé (Eppig and O'Brien 1996; O'Brien *et al.* 2003). Ce succès chez la souris a servi de base de travail et de réflexion pour les travaux chez les grands mammifères. La plupart des études se basent sur la culture de tissu frais, mais de nombreux travaux traitent également de la culture de tissu après congélation/décongélation.

A. Travaux à partir du tissu ovarien frais

A partir des follicules immatures du tissu ovarien, il est possible d'envisager la folliculogénèse *in vitro* de 3 manières différentes: à partir du complexe cumulus-ovocytes COCs extrait du follicule, à partir de follicules entiers isolés, ou à partir du tissu entier. Ces différentes techniques peuvent se succéder au cours d'une même culture.

Contrairement au modèle murin, pour lequel la folliculogénèse *in vitro* est complète à partir des follicules primordiaux, chez les grands mammifères les résultats pour obtenir des ovocytes mûrs ont été obtenus uniquement pour des follicules déjà bien évolués en croissance. Ces différences s'expliquent pour différentes raisons: l'acquisition de la compétence

méiotique et du développement de l'ovocyte passe par un délai de folliculogénèse beaucoup plus long pour les grands mammifères : 6 mois pour la brebis (Driancourt *et al.* 1985), 6 à 12 mois pour la femme (Gougeon 1986) vs 20 jours pour la souris ; il existe une différence de taille entre les follicules préovulatoires, 0,5 mm chez la souris vs 13 mm pour la brebis (Tsonis *et al.* 1984) vs 20 mm pour la femme (Gougeon 1986) ; le comportement des follicules murins en culture semble plus adapté aux conditions *in vitro* que les follicules des grands mammifères (Ksiazkiewicz 2006). De plus, les modèles de cultures de follicules isolés ou de complexe cumulus-ovocyte sont malaisés à mettre en place compte tenu de la difficulté à extraire ces follicules ou complexes de leur structure ovarienne plus fibreuse chez la femme que chez la souris. Chez la femme, comme chez la brebis, pour isoler des follicules immatures il faut procéder par des étapes de dissection mécanique difficile et/ou de digestion enzymatique potentiellement cytotoxique (Roy and Treacy 1993; Abir *et al.* 1997; Muruvi *et al.* 2005).

1. Culture de follicules en croissance

Pour les grands mammifères, les résultats les plus probants ont été obtenus à partir de follicules déjà bien évolués en croissance. Chez le porc, à partir de complexe cumulus-ovocytes (COC) isolés de follicules préantraux de 0,3 mm, Wu *et al.* ont obtenu des embryons évoluant jusqu'au stade blastocyste (Wu *et al.* 2001). Chez le bovin, à partir de COC isolés de follicules antraux de 0,5 mm, des équipes ont présenté des grossesses et des naissances de veaux en bonne santé (Yamamoto *et al.* 1999; Hirao *et al.* 2004).

Chez l'ovin, à partir de complexe cumulus ovocyte d'un diamètre de 190 à 240 μm mis en culture pendant 30 jours, Newton *et al.* ont observé la formation d'un antrum (Newton *et al.* 1999). Au cours d'une autre étude, à partir de follicules préantraux cultivés isolément, un antrum s'est formé au bout de 6 jours de culture (Cecconi *et al.* 2004). Toujours à partir de

follicules préantraux isolés, cultivés selon 2 conditions d'oxygénation différentes, des ovocytes extraits de ces follicules et placés en maturation dans un deuxième temps ont présenté 4 à 5% d'ovocytes au stade de métaphase II (Cecconi *et al.* 1999). Des ovocytes issus de la ponction de follicules antraux d'un diamètre supérieur à 2 mm, et mis en maturation pendant 24 heures, ont été fécondé in vitro et ont donné naissance à des agneaux en bonne santé (Brown and Radziewicz 1998).

Chez la femme, la culture de quelques follicules préantraux et de jeunes follicules antraux pendant 4 semaines a montré la formation d'un antrum, une augmentation de la taille folliculaire associée à une augmentation de la production d'estradiol (Abir *et al.* 1997). Chez l'humain, les résultats les plus notables concernent l'ultime étape de maturation in vitro.

2. Maturation in vitro

Le terme de maturation in vitro est actuellement réservé à la dernière étape de maturation de l'ovocyte issu de follicules antraux sélectionnables mais encore non dominants. La MIV permet le passage des ovocytes du stade vésicule germinative (issus des follicules sélectionnables) au stade métaphase II. La MIV est effective depuis 1991 avec une première grossesse de triplé obtenue suite au transfert de 5 embryons (Cha *et al.* 1991). Depuis cette technique est passée dans la pratique de nombreux laboratoires du monde entier (Trounson *et al.* 1994; Le Du *et al.* 2005; Soderstrom-Anttila *et al.* 2005; Lornage 2006)

3. Culture des follicules primordiaux

La culture de follicules isolés primordiaux est difficile chez les grands mammifères. Chez le porc Telfer et al ont observé une absence de croissance (Telfer 1998). Chez la femme des cultures ont montré une multiplication des cellules de la granulosa en 24 heures (Abir *et al.* 1999; Abir *et al.* 2001) mais aucun travail ultérieur n'a confirmé une possible entrée en

croissance des follicules primordiaux isolés à partir de tissu frais (Ksiazkiewicz 2006). L'absence apparente d'initiation des follicules primordiaux lorsqu'ils sont isolés suggère la nécessité d'entretenir un environnement cellulaire qui permette les échanges auto et/ou paracrines. Pour les follicules de la réserve, la plupart des études sont réalisées à partir de culture organotypique de tissu ovarien qui maintient ces échanges. A partir de follicules primordiaux, toutes les cultures concernant des mammifères de grande taille montrent une initiation de croissance mais également un blocage de croissance soit au stade primaire pour le bovin, le babouin, la chèvre et la brebis (Wandji *et al.* 1996; Wandji *et al.* 1997; Silva *et al.* 2004; Mery *et al.* 2006), soit au stade secondaire précoce chez la femme (Hovatta *et al.* 1997; Wright *et al.* 1999; Louhio *et al.* 2000; Hreinsson *et al.* 2002; Carlsson *et al.* 2006). Hovatta *et al.* ont été les premiers à constater une initiation de croissance des follicules primordiaux jusqu'au stade secondaire au cours d'une culture de 15 à 21 jours (Hovatta *et al.* 1997; Hovatta *et al.* 1999). Pour Wright *et al.* à l'issue d'une culture de 15 jours, la croissance folliculaire est initiée mais n'est pas favorisée par l'ajout de FSH qui par contre améliore la survie folliculaire (Wright *et al.* 1999). Des résultats identiques ont été constatés au bout de 2 semaines lorsque le milieu de culture est supplémenté avec de l'insuline, de l'IGFI et de l'IGFII (Louhio *et al.* 2000). L'ajout de GDF9 favorise le passage du stade primaire au stade secondaire (Hreinsson *et al.* 2002) ; à l'inverse au bout de 7 jours de culture, l'AMH bloque l'initiation de croissance (Carlsson *et al.* 2006).

Pour obtenir une folliculogénèse complète chez un grand mammifère, comparable à ce qui été réalisé chez la souris, il faudra peut-être disposer d'une culture en deux temps. Le premier temps dévolu à la culture du tissu ovarien permettra une croissance des follicules de réserve jusqu'aux follicules préantraux de grande taille. Le second temps permettra de dissocier ces follicules de grande taille du reste du tissu et les faire croître isolément. Ceci afin d'obtenir des follicules antraux tardifs capables de donner des ovocytes nécessitant

uniquement une maturation in vitro finale. Récemment, l'équipe de Telfer et al a utilisé cette méthode de culture en deux étapes chez la femme. Au cours d'une première étape de culture de 6 jours de cortex, des follicules ont pu se développer jusqu'au stade secondaire. Ces follicules d'un diamètre compris entre 66 et 132 μm ont été ensuite isolés mécaniquement et placés en culture pendant 4 jours, le milieu étant supplémenté ou non avec 100 ng/ml d'activine A. Au 4^e jour, des cavités antrales ont été observées dans le groupe traité avec de l'activine A, avec un accroissement du diamètre folliculaire dès le 2^e jour de culture (Telfer *et al.* 2008).

B. Travaux à partir du tissu ovarien congelé / décongelé

De multiples méthodes permettent d'évaluer l'intégrité et la viabilité du tissu ovarien après congélation/décongélation. L'utilisation de la microscopie optique pour l'étude histologique (Paynter *et al.* 1999; Demirci 2002), de la microscopie électronique pour l'étude de l'ultrastructure (Santos *et al.* 2006), l'utilisation de colorant vital (Courbiere *et al.* 2005), ou l'exploration de l'apoptose (Bedaiwy *et al.* 2006; Martinez-Madrid *et al.* 2007). Mais pour évaluer la fonctionnalité du tissu, la culture in vitro demeure la seule méthode possible (Santos *et al.* 2007).

Des travaux de culture in vitro peuvent s'envisager à partir de la congélation/décongélation de follicules isolés, comme chez la souris (de la Pena *et al.* 2002) ou la brebis (Amorim *et al.* 2004; Amorim *et al.* 2007) et également de la congélation/décongélation d'ovaire entier chez les grands mammifères comme chez la femme (Bedaiwy *et al.* 2006; Martinez-Madrid *et al.* 2007) ou la brebis (Courbiere *et al.* 2006; Imhof *et al.* 2006).

Les études reprises dans ce chapitre concernent uniquement celles mettant en jeu la congélation de cortex ovarien pour les mammifères de grande taille ou la congélation d'ovaire

entier pour les rongeurs. Pour la souris et le rat, il n'existe pas de réelle séparation entre le cortex et la médullaire. L'ensemble de l'ovaire est constitué de follicules et compte tenu de la taille des ovaires, la congélation de l'ovaire entier correspond à une congélation de cortex pour les autres mammifères.

Comme pour le tissu frais, les études *in vitro* réalisées à partir du tissu ovarien congelé/décongelé peuvent concerner, le tissu entier, des follicules entiers isolés ou des complexes cumulus-ovocytes.

1. Culture de follicules en croissance

Pour la souris, à partir d'ovaire congelé selon un protocole de congélation rapide, Segino et al. ont isolé de jeunes follicules préantraux et quelques follicules primaires et les ont placés en culture sur la base du protocole de Cortvrindt et al. (Cortvrindt *et al.* 1996). Les ovocytes issus de ces follicules ont été secondairement mis en maturation, fécondés *in vitro* et ont permis une segmentation et une évolution jusqu'au stade blastocyste (Segino *et al.* 2005). Pour Segino et al. l'obtention des meilleurs taux de fécondation est observée à J16. Pour Cortvrindt et al. en tissu frais, la durée de croissance optimale pour les taux de fécondation se situe entre 12 et 14 jours, à J16 les résultats chutent (Cortvrindt *et al.* 1996). Par rapport au tissu frais, les follicules extraits du tissu congelé/décongelé requerraient 2 jours supplémentaires pour bénéficier d'une croissance *in vitro* optimale. A partir d'ovaire vitrifié, Hasegawa et al ont placé en culture de 6 jours des complexes cumulus-ovocytes issus de follicules «préantraux» d'un diamètre de 125 à 140 μm . Des souriceaux issus de la fécondation *in vitro* des ovocytes extraits de ces complexes, sont nés en bonne santé (Hasegawa *et al.* 2006).

Pour la brebis, Muruvi et al ont extrait et isolé du tissu congelé par digestion enzymatique des follicules primaires d'un diamètre de 60 μm et après plus de 42 jours de

culture ont obtenu des follicules avec un diamètre de 75 μm semblable à celui de follicules secondaires. A partir du tissu congelé, ils ont également extrait des follicules secondaires dont le diamètre a évolué de 78 μm à 99 μm pendant 28 jours de culture (Muruvi *et al.* 2008).

Suite à un protocole de congélation lente, selon différents cryoprotecteurs testés, Cecconi et al ont isolé du cortex des follicules préantraux et les ont placés en culture pendant 10 jours. Les meilleurs résultats en terme de survie ont été observés avec l'éthylène glycol 1,5M: 42% de survie vs 25% pour le DMSO 1,5M (56% de survie pour le tissu frais). Les diamètres moyens des follicules préantraux ont augmenté de 170 μm à 300 μm au cours de la culture (Cecconi *et al.* 2004).

Suite à une congélation lente de cortex ovarien, Newton et al ont isolé des complexes cumulus-ovocyte d'un diamètre de 190 à 240 μm issus de follicules préantraux. Ils ont observé la formation d'un antrum au bout de 30 jours de culture (Newton *et al.* 1999).

Pour la femme, à notre connaissance aucune étude ne fait référence à la culture *in vitro* de follicules en croissance extrait de tissu ovarien congelé/décongelé.

2. Maturation *in vitro*

Concernant la MIV, à notre connaissance, aucune étude ne fait référence à des ovocytes extraits de follicules antraux issus de tissu ovarien congelé et mis en maturation. Pour la MIV et la cryoconservation, des travaux récents suggèrent d'associer à la congélation du tissu ovarien la ponction de follicules antraux de l'ovaire après son exérèse, la maturation *in vitro* des ovocytes récupérés et la vitrification des ovocytes en métaphase II (Huang *et al.* 2007).

3. Culture de follicules primordiaux

Pour les mammifères, aucune culture *in vitro* complète à partir de follicules primordiaux n'a donné de résultats en terme de grossesse et de naissance. Les seules naissances à partir de follicules primordiaux ont été obtenues suite à une combinaison de 2 techniques. Une allogreffe de 14 jours de tissu congelé/décongelé avec une méthode lente a été réalisée dans un premier temps permettant une initiation de croissance des follicules primordiaux. Dans un second temps des follicules préantraux précoces ont été isolés mécaniquement et placés en culture *in vitro* pendant 12 jours selon le protocole de Cortvrindt et al. (Cortvrindt *et al.* 1996). Au 12^e jours, une maturation finale de 14 à 16 heures a permis l'obtention d'ovocytes en métaphase II qui fécondés *in vitro* ont donné naissance à des souriceaux viables (Liu *et al.* 2000; Liu *et al.* 2001). Une étude réalisée avec des ovaires de souris adultes, congelés par une méthode de vitrification a, par cette méthode en deux temps, permis la naissance de 10 souriceaux (Kagawa *et al.* 2007).

Chez la brebis, Muruvi et al ont extrait et isolé du tissu après digestion enzymatique des follicules primordiaux. Leur mise en culture pendant 28 jours a montré une survie correcte de 30 à 50% selon la composition des milieux utilisés et a permis leur croissance, mise en évidence par une augmentation du diamètre des follicules (Muruvi *et al.* 2005).

Santos et al ont comparé après congélation/décongélation de tissu ovarien ovin, la culture pendant 5 jours de follicules primordiaux isolé et la culture de tissu entier. Ils ont dans le même temps testés 2 cryoprotecteurs : DMSO à 1,5M ou Ethylène Glycol à 1,5M. Quelles que soient le méthode de congélation et de culture ils ont trouvé après 5 jours une baisse de la viabilité des follicules par rapport au contrôle en frais (Figure 24). Pendant les 5 jours de culture, la croissance *in vitro* des follicules primordiaux issus de la culture de tissu entier congelé/décongelé a montré des résultats identiques aux témoins frais alors que la culture de

follicules primordiaux secondairement isolés a montré une baisse de la croissance (Figure 25) (Santos et al. 2007).

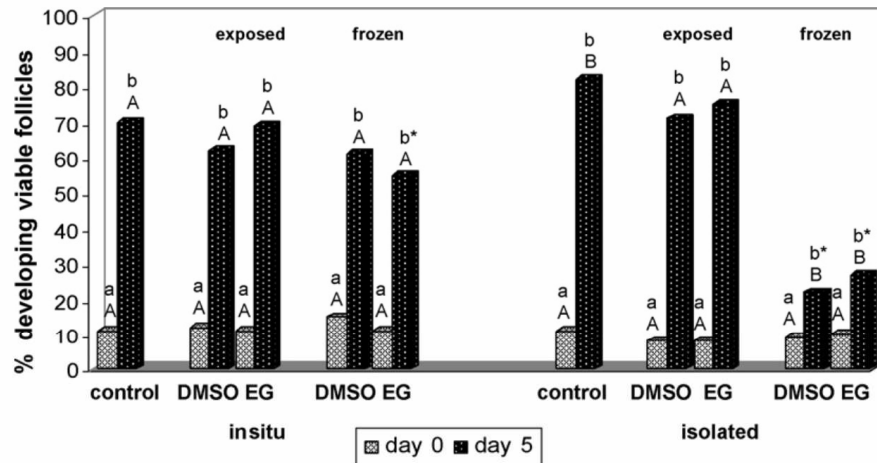


Figure 24 Percentage of developing follicles among viable early-stage (i.e. primordial and developing) follicles, which had been untreated cryoprotectant(DMSO or EG)-exposed or cryopreserved, and then cultured for 5 days (day 5) or not cultured (day 0). Viability was scored with use of trypan blue staining. In each treatment, 104–236 viable early-stage follicles were examined. *Differs significantly from control (in situ or isolated) follicles ($P < 0.05$). ^{a,b}Differs significantly between day 0 and day 5 ($P < 0.05$). ^{A,B}Differs significantly between in situ and isolated follicles at same procedure (culture day, exposure or cryopreservation, cryoprotectant used) ($P < 0.05$).

(Santos et al. 2007)

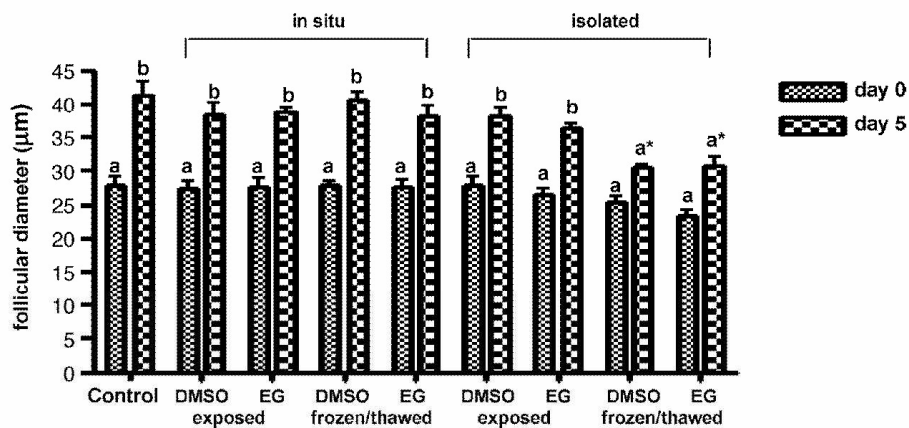


Figure 25 Follicular diameter of early-stage viable untreated (control), exposed and frozen/thawed early-stage follicles that were uncultured (day 0) or in vitro-cultured during 5 days (day 5). *Values differs significantly from that of untreated (control) follicles ($P < 0.05$). ^{a,b}Significantly different values at the start (day 0) or finish (day 5) of the culture period ($P < 0.05$). (Santos et al. 2007)

Dans notre équipe, Demirci et al. ont retrouvé, après congélation/décongélation par méthode lente de tissu ovarien ovin, 85, 7% de follicules atrétiques à 4 jours de culture, les follicules viables restants n'ayant pas montré d'entrée en croissance (Demirci, 2002). Cette baisse de capacité de reprise de la fonction de développement après congélation a été mise en évidence chez la souris. Les follicules primordiaux perdent leur pouvoir de croissance en culture si le tissu ovarien a été au préalable congelé soit par congélation lente soit par vitrification. Le processus de congélation/décongélation amplifierait le phénomène de mort cellulaire des cellules ovariennes par apoptose et nécrose (Choi *et al.* 2007).

Pour le modèle humain, des équipes ont travaillé avec des ovaires issus de populations d'âge différent : ovaire « adulte » et ovaire de fœtus.

Pour les ovaires adultes, en culture *in vitro* de tissu ovarien après congélation/décongélation, la plupart des études montrent des résultats intéressants mais limités avec à l'issue de la culture quelques dizaines de follicules viables comptés.

Pour Isachenko et al. après 21 jours de culture, pour 10 techniques de vitrification testées, les survies varient de 0% à 18% avec pour la meilleure méthode, 7 follicules viables comptés contre 32 follicules atrétiques (Isachenko *et al.* 2003). Ces résultats semblent améliorés si une agitation du milieu de culture est réalisée (Isachenko *et al.* 2006).

Pour Hovatta, après 4 à 9 jours de culture de tissu congelé par méthode lente, 60% de follicules atrétiques sont retrouvés (26 follicules atrétiques contre 17 follicules viables). après 10 à 15 jours de culture, pour une atrésie de 33%, seuls 4 follicules atrétiques vs 8 follicules viables ont été comptabilisés (Hovatta *et al.* 1997).

Pour Li et al, quelles que soient les méthodes de congélation employées, les taux de survie après deux semaines de culture sont médiocres : 25,0% de viabilité pour la congélation lente et 24,3% pour la vitrification. Même si la proportion de follicules primaires a augmenté, seuls 21 follicules primaires ont été comptés vs 15 follicules primordiaux après 2 semaines de culture (Li *et al.* 2007).

Suite à un protocole de congélation lente, l'équipe de Schmidt et al a compté un nombre important de follicules après 4 semaines de culture. Pour 2 patientes sur 6, aucun follicule n'a été retrouvé. Pour les 4 autres et selon 4 conditions de culture différentes (milieu de culture seule, ajout de testostérone, d'AMH, ou association AMH+testostérone), 556 follicules viables ont été comptés au total à la fin de la culture (Schmidt *et al.* 2005).

Récemment Sadeu et al ont réalisé une culture sur 28 jours avec des ovaires issus de 4 femmes âgés de 7 à 27 ans. Une forte proportion de follicules atrétiques a été retrouvée (pour 3 patientes, 96 à 99% d'atrésie à J 28) sauf pour la jeune fille de 7 ans (41,8% d'atrésie à J28). Dans cette étude, une initiation de croissance semble se produire avec une augmentation de la proportion de follicules primaires et secondaires dès le 7^e jour de culture (Sadeu *et* Smitz. 2008).

Pour les ovaires de fœtus humain après congélation/décongélation par un protocole lent, Biron-Shental et al. ont observé une survie correcte en culture pendant 4 semaines mais sans aucune croissance (Biron-Shental *et al.* 2004).

Pour Sadeu et al., après congélation/décongélation par un protocole lent, la croissance du tissu fœtal ne s'observe qu'après 63 jours de culture (Sadeu *et al.* 2006). Chez le fœtus, la survie folliculaire semble meilleure par rapport à l'ovaire « adulte » mais la croissance plus longue à observer en culture. Ces différences de comportement peuvent s'expliquer par un mécanisme de croissance folliculaire distinct entre le tissu fœtal et le tissu adulte. Ces

différences ont été évoquées par Gougeon et al chez le primate (*Macaca fascicularis*). Ils ont observé un immunomarquage différent des facteurs de croissance TGF β 1, 2, 3, SCF, GDF9 EGF et TGF α , lorsqu'il était réalisé sur du tissu ovarien foetal ou sur du tissu adulte. Le marquage est différents selon l' « âge » du tissu observé (Gougeon and Busso 2000).

C. Conditions de cultures

Pour améliorer les conditions de cultures, il est possible de jouer sur différents paramètres, la composition du milieu, la température, la composition de l'atmosphère, ou l'ajout de certains facteurs de croissance. Le support de culture fait partie des éléments à évaluer.

Système de coculture.

Avant l'apparition des systèmes de culture embryonnaire par méthodes séquentielles, et leur interdiction d'utilisation dans de nombreux domaines, les systèmes de co-culture étaient largement employés pour de nombreuses espèces et en particulier chez l'humain (d'Estaing *et al.* 2001). En partant des résultats obtenus sur l'embryon ; des auteurs ont testé la co-culture sur le tissu ovarien. Yeoman et al ont observé après congélation/décongélation par méthode lente ou par vitrification de tissu ovarien de primate, un effet bénéfique de la présence de cellules fibroblastiques foetales de souris sur une culture de 5 jours. La viabilité (carboxyfluoresceine, succinimidyl ester et iodure de propidium) des follicules est améliorée par la coculture de 5 jours par rapport à celle observée à la décongélation.(Figure 26).

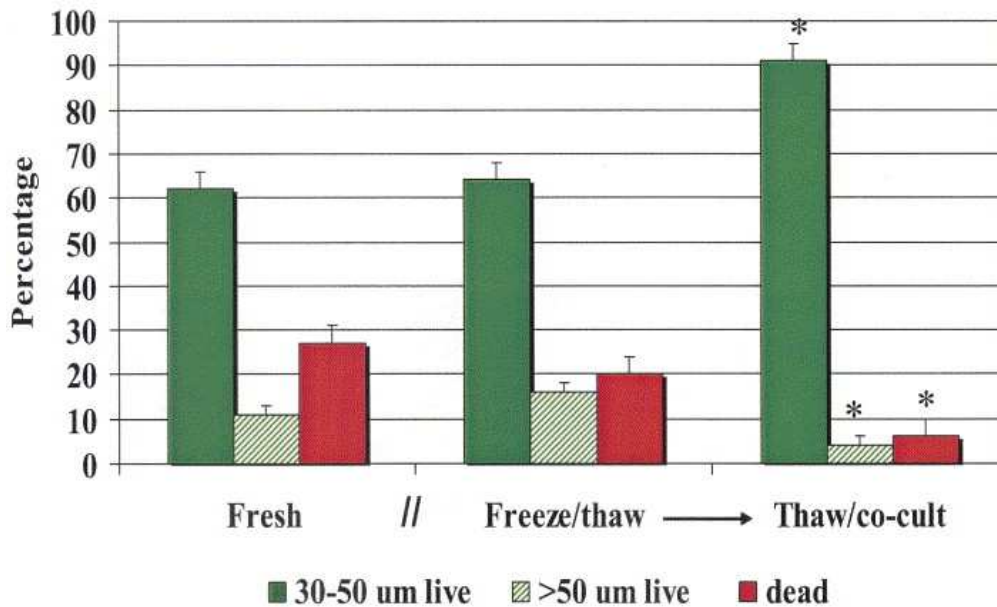


Figure 26 Follicle sizes were analyzed in a combined subset of thawed then cocultured tissues from four animals. Follicle size data from eight fresh tissues are also shown. Follicles 30–50 μm in diameter were the primary category in thawed tissue and became more so after coculture (co-cult). The fresh and thawed distributions were similar. Results are presented as means \pm SE. Green filled bars, 30–50 μm live; green-hatched bars, >50 μm live; red solid bars, dead. * $P < .01$. (Yeoman *et al.* 2005)

Concernant la co-culture embryonnaire, 3 types de systèmes différents ont émergé en fonction de la lignée cellulaire utilisée (Lornage *et al.* 1995).

- Les vésicules trophoblastiques (Blakewood *et al.* 1990).
- Les lignées cellulaires appartenant au tractus génital féminin dont les cellules tubaires (Xu *et al.* 1992), les cellules épithéliales utérines (Jayot *et al.* 1995), les fibroblastes utérins (Wiemer *et al.* 1989), les cellules de la granulosa (Plachot *et al.* 1993).
- Les lignées de cellules extra génitales essentiellement les cellules épithéliales de rein d'origine bovine (lignée MDBK) ou simiesque (lignée Véro) (Ouhibi *et al.* 1990). Ces cellules ont été choisies compte tenu de leur origine embryologique mésoblastique identique à celles du tractus génital.

Modes d'action des systèmes de co-cultures.

Les mécanismes d'action des monocouches cellulaires ne sont pas complètement élucidés.

- Elimination des composés cytotoxiques

Comme pour l'embryon, certains facteurs présents dans les milieux de culture comme l'hypoxanthine peuvent avoir des effets négatifs sur la culture et peuvent être éliminés par les cellules somatiques (Loutradis *et al.* 1987). Les cellules somatiques seraient capables de réduire les concentrations en O₂ dans le milieu de culture et réduire la dégénérescence embryonnaire due aux radicaux libres (Fukui *et al.* 1991).

- Libération de facteurs cytotrophiques

Les cellules synthétisent tous les acides aminés essentiels (Janny *et al.* 1993) et certaines glycoprotéines comme celles libérées par l'épithélium tubaire chez l'humain (Maguiness *et al.* 1992) qui joueraient un rôle possible dans la survie et la croissance cellulaire.

- Contacts directs : cellules-tissu avec échanges de signaux transmembranaires.

Les contacts directs entre les cellules et le tissu ne semblent pas forcément nécessaires, certaines études utilisant des milieux conditionnés montrent des résultats équivalents en ce qui concerne la croissance embryonnaire (Mugleton-Harris *et al.* 1990) voire supérieurs (d'Estaing *et al.* 2001). Pour le tissu ovarien, ces contacts pourraient jouer un rôle non négligeable.

Avant de tester l'apport de la co-culture sur la survie tissulaire après congélation/décongélation, nous avons dans un premier temps comparé en tissu frais, la co-culture sur cellules Véro et la culture sur support Millicel.

D. Maturation in vitro

Un des intérêts de la MIV est de pouvoir utiliser en médecine humaine les ovocytes issus des follicules sélectionnables (en moyenne une dizaine chez la normo ovulante, voire plus pour le syndrome des ovaires polykystiques) sans passer par la stimulation ovarienne et éviter les risques induits (syndrome d'hyperstimulation ovarienne). L'intérêt de cette technique est accru pour les femmes souffrant du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). En effet dans cette population, les follicules sélectionnables sont plus nombreux, la stimulation folliculaire est difficile à réaliser et les risques d'hyperstimulations sont augmentés. La MIV est effective depuis 1991 et cette technique est passée dans la pratique de nombreux laboratoires du monde entier (Trounson *et al.* 1994; Le Du *et al.* 2005; Soderstrom-Anttila *et al.* 2005; Lornage 2006). Fin 2006, plus de 425 enfants étaient nés dans le monde par cette technique (Lornage 2006). Comme cela a été démontré pour la croissance folliculaire in vitro chez la souris (Kerjean *et al.* 2003), la maturation in vitro suscite des interrogations quant à son innocuité par rapport à la mise en place des gènes impliqués dans l'empreinte parentale lors de la gamétogenèse (Borghol *et al.* 2006). En collaboration avec l'équipe INSERM 418, nous avons étudié la méthylation de certains de ces gènes sur les ovocytes immatures non utilisés. Ces ovocytes étaient issus soit de cycles de tentatives de fécondation in vitro avec stimulation ovarienne, soit de cycles de maturation in vitro sans stimulation ovarienne.

ETUDES EXPERIMENTALES CHEZ LA BREBIS

Dans un premier temps, notre modèle d'étude s'est porté sur l'ovine compte tenu de ses similitudes avec le modèle féminin, du point de vue de l'histologie et de la physiologie de la folliculogénèse.

Depuis 10 ans, l'équipe de recherche du département travaille sur la congélation du tissu ovarien et sur la maturation des follicules primordiaux après décongélation. Les 2 voies principales de maturation ont été explorées : l'autogreffe avec plusieurs naissances obtenues chez la brebis (Salle *et al.* 2002; Salle *et al.* 2003) et la croissance *in vitro* qui fait l'objet des études rapportées ici.

La culture de tissu ovarien doit se poursuivre sur une longue période pour permettre d'obtenir des follicules jusqu'au stade antral. Dans notre équipe, d'après les résultats de Demirci (Demirci, 2002), le tissu ovarien frais en culture conserve une bonne survie jusqu'à 30 jours de culture (25,71 % de follicules atreétiques et 41,91% de follicules primaires) mais de rares follicules secondaires sont observés évoquant un blocage de la croissance folliculaire. Ce blocage de croissance en tissu frais au stade primaire observé dans les cultures réalisées au cours des travaux précédents révèle un possible déficit en facteurs de croissance dans le milieu de culture. Un éventuel défaut d'expression en culture du système GDF9/BMP15 pourrait être à l'origine du défaut du passage au stade de follicule secondaire. Au cours de nos travaux, un de nos objectifs a été d'explorer par RT-PCR et par immunohistochimie l'expression de GDF9, BMP15 et leurs récepteurs en culture de tissu frais.

Les bons résultats en terme de survie pour la culture de tissu avec une épaisseur de cortex de 0,5 mm n'ont pas été retrouvés pour la culture de tissu ovarien congelé : 89,9% de follicules atreétiques et 1,8% de follicules primaires au 10^{ème} jour de culture (Demirci, 2002).

Pour augmenter le taux de survie de la culture *in vitro* du tissu après congélation/décongélation, des auteurs ont décrits des systèmes de co-cultures (Yeoman *et al.* 2005). Dans un premier temps sur tissu frais, nous avons comparé l'influence de 2 supports: la co-culture sur cellule Véro et la culture sur support millicell (Millicell-CM; Millipore Co., Bedford, MA, USA).

Les protocoles de congélation mis au point pour des cortex d'ovaires de 1mm d'épaisseur ont prouvé leur efficacité dans l'autogreffe avec l'obtention de plusieurs naissances (Salle *et al.*, 2002). Partant de ces résultats, nous avons envisagé différentes hypothèses de travail. Les protocoles de congélation déjà testés pour une épaisseur de 1mm permettent une croissance *in vivo* après congélation/décongélation, une croissance *in vitro* devrait en théorie être possible. Une deuxième raison pour laquelle nous avons voulu tester cette épaisseur de 1 mm, est que tous les fragments ovariens de femmes, conservés au département, ont une épaisseur de 1 mm. Nous avons donc étudié l'influence de l'épaisseur sur la culture en comparant l'épaisseur de 1 mm à celle 0,5 mm et ceci dans un premier temps en tissu frais.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la culture de tissu congelé avec des fragments de 1 mm d'épaisseur issus de différents protocoles de congélation.

MATERIELS ET METHODES

I. Préparation du tissu ovarien

A. Prélèvement à l'abattoir

La récupération des ovaires s'est effectuée aux abattoirs de Lyon Corbas sur de agnelles fraîchement abattues. Un seul ovaire par brebis est récupéré stérilement et conservé dans du milieu de survie X-vivo (Bio Whittaker, Walkersville, ML, USA), le transport est réalisé dans un récipient réfrigéré, la température se situant aux environ de +10°C.

B. Préparation au laboratoire

Le délai d'acheminement des ovaires de la récupération jusqu'au traitement au laboratoire n'a pas excédé 45 min.

A température ambiante, chaque ovaire est découpé en deux dans du milieu X-vivo (BioWhittaker), la médullaire est retirée à l'aide de ciseaux courbes et de scalpel laissant une épaisseur de cortex de 1 mm ou de 0,5 mm selon les protocoles. Pour la congélation, les hémiovaires sont coupés en deux pour faciliter leur introduction dans les paillettes de 1 ml (Cryobiosystem, Paris, France). Pour la culture les cortex sont découpés en lamelles de 5 x 5 x 1 mm d'épaisseur ou de 5 x 5 x 0.5mm d'épaisseur selon les protocoles.

II. Culture in vitro : tissu ovarien frais

A. Mise en culture

1. Milieu de culture

Le milieu est établi compte tenu des données de la littérature et des travaux précédents de notre équipe. Pour limiter l'influence de la composition du milieu de culture sur l'expression de certains facteurs que nous cherchons à détecter, nous avons utilisé le milieu de culture de base sans ajouter de facteurs de croissance :

Le milieu DMEM-Ham's F-12 (Sigma, St Louis, USA) enrichi en ITS+1 (Insuline 10 mg.l⁻¹, transferrin 5.5 mg.l⁻¹, selenium 5 µg. l⁻¹, BSA 0.5 mg.l⁻¹, acide linoléique 4.7 µg. l⁻¹) (Sigma, St Louis, USA), BSA 1.25 mg.l⁻¹ (Sigma, St Louis, USA), streptomycine 50 µg. l⁻¹ (Sigma, St Louis, USA), pénicilline-G 75 µg. l⁻¹ (Sigma, St Louis, USA) est préparé extemporanément et laissé incubé 2 heures dans l'étuve avant utilisation.

2. Technique de culture

Les cultures sont réalisées à 37°C, sous atmosphère saturée en vapeur d'eau (5% O₂, 90% N₂, 5% CO₂).

Avant d'être déposés en culture, les cortex préalablement amincis sont découpés en lamelles de 5x5x1mm d'épaisseur ou 5x5x0.5 mm d'épaisseur.

Pour chaque jour de culture qui se déroule sur une période de 4 à 15 jours, 2 lamelles du même hémiovaire sont posées par puit (2 pour J2, 2 pour J4, etc.), 2 lamelles sont également fixées à J0 (pour le tissu congelé deux temps J0 sont réalisés, avant et après congélation).

La culture s'est effectuée sur des boîtes à 4 puits (Nunc, Brand products, Denmark), sur des filtres de polycarbonate de 0.4 μm (Millicell-CM; Millipore Co., Bedford, MA, USA).

Figure 27.

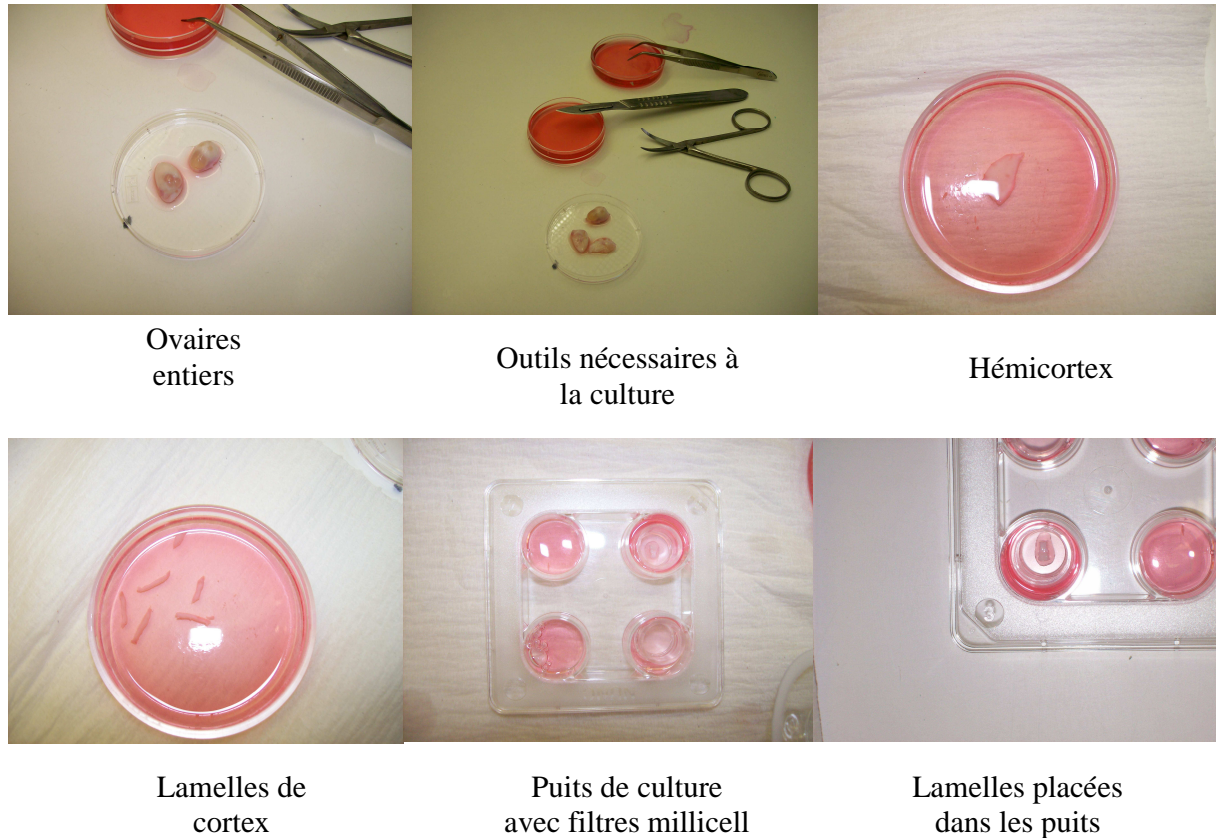


Figure 27 : mise en place de la culture in vitro

Chaque puit contient 500 μl de milieu et le volume est ajusté pour que les lamelles soient recouvertes d'un film généré par la tension de surface du milieu. 200 μl de milieu sont changés tous les 2 jours.

3. Différentes séries de culture

Pour chaque série, 5 hémiovaires de 5 brebis différentes sont étudiés.

◆ Étude de GDF9 et BMP15

Les cortex sont découpés en lamelles de 5x5x0.5mm d'épaisseur.

Deux lamelles sont déposées par puit, et sont cultivées pendant 15 jours. Le jour du recueil (J0) et à J2, J4, J7, J10 et J15. Les lamelles sont fixées soit dans du liquide de Bouin pour l'examen morphologique soit dans du formol à 4% dans du PBS pour l'immunohistochimie. Des lamelles sont plongées dans l'azote liquide pour la RT-PCR.

◆ Étude de l'influence de l'épaisseur du cortex sur la culture

Les cortex sont découpés soit en lamelles de 5x5mm pour une épaisseur de 1mm, soit en lamelles de 5x5mm pour une épaisseur de 0,5mm et sont placées en culture.

Les conditions de culture sont celles décrites ci-dessus.

Pour chaque jour de culture étudié, 2 lamelles sont fixées dans du Bouin (Chimie-Plus, Denicé, France) pour l'étude morphologique.

N=5	Série 1	Série 2	Série 3
Épaisseur du cortex	0.5 mm	1 mm	1 mm
Nb de jours de culture	15 jours	4 jours	10 jours

Tableau 1 : différentes séries de culture de tissu frais selon l'épaisseur du tissu

La série 2 de 1mm a été effectuée sur 4 jours pour observer les résultats dans les premiers jours de culture. Compte tenu des premiers résultats, la série 3 a été prolongée sur 10 jours.

- ◆ Étude de l'influence du support sur la culture : comparaison support filtre millicell® et cellules Véro

Préparation du tissu ovarien

Pour les cultures concernant les deux types de supports, les cortex sont découpés en lamelles de 5x5mm pour 0.5mm d'épaisseur. Pour chaque jour de culture étudié, 2 lamelles sont fixées dans du liquide de Bouin pour l'étude morphologique.

Préparation du tapis monocellulaire de Cellules Véro :

Les cellules Véro (Bio Whittaker, Walkersville, ML, USA), cellules épithéliales de rein de singe Vervet en lignée continue sont issues des lignées utilisées au laboratoire de Virologie de la Faculté de Médecine Rockefeller (Pr Lina). Leur stérilité est garantie par un contrôle bactérien sur Bouillon Trypticase Soja (bioMérieux, Marcy l'étoile, France) à 37°C, qui est réalisé à chaque trypsination, avec une observation pendant 15 jours, associé à une recherche de mycoplasmes tous les deux mois par le test Myco-Alert® (Cambrex BioScience, Emerainville, France).

Le milieu de culture est le suivant: Eagle MEM (Cambrex) avec 1% de L-Glutamine 200 mM, 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Néomycine (Sigma, St Louis, MO, USA), 200 unités. ml^{-1} de Pénicilline, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Streptomycine (Sigma), Hépes à 1 M (Sigma) et 2% de Sérum de Veau Foetal inactivé (Cambrex).

A partir de cellules Véro cultivées sur boîtes Falcon 75 cm^2 , la densité et la qualité de la nappe cellulaire sont appréciées au microscope optique.

Un mélange Versène-trypsine est préparé : 10 ml de trypsine à 0,25% 1X (Eurobio, Les Ulis, France) à 100 ml de versène 0,02% (agents chélateurs à base d'EDTA): NaCl (Prolabo,

Fontenay sous bois, France) 8 g ; KCl (Merck, Lyon, France) 0,2 ; Na₂HPO₄ 2H₂O (Merck) 1,44 g ; KH₂PO₄ (Merck) 0,2 g ; EDTA (Sigma) 0,2 g ; Eau permutée qsp 1 litre.

Tout le milieu contenu dans le flacon de cellules est rejeté.

Le mélange versène-trypsine est versé dans le flacon. Après 1 minute d'action, le mélange versène-trypsine est vidé rapidement du côté « opposé » à la nappe cellulaire, le flacon est mis dans l'étuve à 37°C couché. Quand les cellules sont détachées de la paroi (contrôle visuel au microscope optique inversé), 10 ml du milieu sont ajoutés et une agitation légère permet la dissociation des cellules. Après homogénéisation, la concentration est estimée par cellule de Makler®. 70 000 à 100 000 cellules sont déposées dans 1 ml de milieu dans des boîtes Nunc 4 puits. Au bout de 2 à 3 jours la confluence cellulaire est appréciée sous microscope inversé et permet l'utilisation ou non des cellules Véro. Pour une culture de 10 jours, ces étapes sont répétées 3 fois, des changements de monocouches de cellules Véro sont effectuées au 4^e et au 8^e jour. A chaque changement, la qualité de la monocouche cellulaire est apprécié au microscope et permet de détecter d'éventuelle plage de lyse.

Pour chaque support, 5 hémioviaires issus de 5 brebis différentes ont été étudiés.

N=5	Série 4	Série 5
support	Millicell	Véro
Nb de jours de culture	10 jours	10 jours

Tableau 2 : différentes séries de culture de tissu frais selon 2 supports de culture.

Milieu de culture

Pour éviter des changements de composition de milieux et un stress pour les cellules Véro, le milieu de culture utilisé pour la culture des lames de cortex sur support millicel et sur cellules Véro a été le milieu de culture des cellules Véro : Eagle MEM (Cambrex) avec 1% de

L-Glutamine 200 mM, 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Néomycine (Sigma), 200 unités. ml^{-1} de Pénicilline, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Streptomycine (Sigma), tampon Hépes à 1 M (Sigma) et 2% de Sérum de Veau Foetal (Cambrex), après inactivation 30 min à 56°C. Pour la culture sur support millicell 500 μl de milieu sont déposés par puit. Compte tenu de la présence de cellules Véro qui consomment également du milieu, nous avons décidé de déposer 1 ml de milieu par puit pour cette dernière méthode et une seule lame de cortex est placée par puit pour les 2 techniques.

La culture s'effectue à 37°C, sous atmosphère saturée en vapeur d'eau (5% O₂, 90 % N₂, 5% CO₂). Les cortex préalablement amincis sont découpés en lamelles 5x5mm pour 0,5 mm d'épaisseur. Pour chaque jour de culture et chaque technique qui se déroule sur une période de 10 jours, 1 lamelle est posée par puit (2 pour J2, 2 pour J4, 2 pour J7, 2 pour J10), 2 lamelles sont également fixées à J0.

La culture s'effectue sur des boîtes à 4 puits (Nunc, Brand products, Denmark), sur des filtres de polycarbonate de 0.4 μm (Millicell-CM; Millipore Co., Bedford, MA, USA) ou sur cellules Véro. Chaque puit contient 500 μl de milieu pour la culture « millicell » et 1 ml pour la culture « Véro ». 250 μl pour « millicell » ou 500 μl pour « Véro » sont changés tous les 2 jours. Au 4^e et au 8^e pour les cellules Véro, un changement du support cellulaire est réalisé.

B. Etude histologique

L'histologie est réalisée au laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital Edouard Herriot (Pr Scaozec).

1. Coupes histologiques

Après inclusion dans la paraffine des coupes semi-sériées de 4 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (Lietz, Germany).

Douze coupes de 4 µm sont réalisées pour chaque hémiovaire et pour chaque temps de culture, ces coupes étant espacées de 60 µm pour éviter de comptabiliser deux fois les mêmes follicules.

2. Coloration

Les coupes sont colorées en HPS : Hématoxyline (Speci, Varennes-sur-allier, France), Phloxine B (Réactifs RAL, Bordeaux, France), Safran (Speci, Varennes-sur-allier, France).

3. Etude morphologique

L'étude morphologique se base sur la classification de (Gougeon 1986).

- Follicule primordial : ovocyte I de 20 à 30 µm entouré de cellules aplaties (<15 cellules).
- Follicule intermédiaire : ovocyte I entouré de cellules cubiques et de cellules aplaties.
- Follicule primaire : ovocyte I entouré d'une couche complète de cellules folliculaires cubiques.
- Follicule secondaire : ovocyte I entouré par au moins deux couches de cellules cubiques.
- Follicule atrétique : noyau ovocytaire pycnotique et/ou cytoplasme vacuolé.

C. Etude de l'expression de GDF9/BMP15 par la technique de RT-PCR

L'objectif est de mettre en évidence l'expression de GDF9 et de BMP15 par la détection de leur ARNm à partir de tissu frais d'ovaire de brebis à deux temps différents de culture.

1. RT-PCR

a) Choix des amorces

Le choix des amorces pour GDF9, BMP15 et d'un gène témoin la β actine ovine a été réalisé à partir de la base de données Gen bank, les amorces devant englober des sites

introniques permettant de différencier après amplification l'ADNc de GDF9 de l'ADN génomique. Tableau 3.

gène cible /taille	Sens	séquence (5' 3')	position	GenBank accession number
GDF9 1 (586 pb)	s	GTTCTGTATGATGGGCACGG	1981-2000	AF078545 Ovis aries
GDF9 2	as	AGGGCGCTACGAGAAGAGTC	3672-3691	AF078545 Ovis aries
BMP15 1 (483 pb)	s	CTATTGCCACCTGCCTGAG	326-345	AF236078 Ovis aries
BMP15 2	as	TTTGCCCAACATGTTCCATG	620-639	AF236078 Ovis aries
β actine 1 (247 pb)	s	CACGGCATTGTCACCAACTGG	303-323	V39357 Ovis aries
β actine 2	as	AGTCCATCAGGATGCCAGTGG	528-550	V39357 Ovis aries

Tableau 3: amorces oligonucleotidiques pour RT-PCR de GDF9 et BMP15

Le cortex ovarien est préparé selon la technique décrite pour la culture *in vitro* et stocké rapidement à -196 °C pour éviter toute dégradation de l'ARN messager.

b) Extraction de l'ARN total par la technique du phénol acide

◆ Principe

L'extraction d'ARN comporte 3 étapes principales, une lyse cellulaire, une extraction au phénol et une précipitation à l'alcool.

Les solvants organiques, le phénol et le mélange chloroforme/alcool isoamylique, provoquent une déprotéinisation efficace, le phénol dénature les protéines en les solubilisant. Contrairement à l'extraction de l'ADN, le phénol est acide (pH compris entre 4 et 5) ce qui rend l'ADN soluble dans cette fraction contrairement à l'ARN. Après centrifugation, deux fractions peuvent être séparés (l'alcool isoamylique facilite la séparation entre la phase aqueuse contenant l'ARN et la phase organique contenant les protéines et l'ADN), le chloroforme élimine les traces de phénol présentes dans la phase aqueuse et une précipitation

par l'isopropanol permet de récupérer l'ARN sous forme de fibres et de le solubiliser ensuite à une concentration choisie.

◆ Protocole

Le travail s'effectue sur glace et sous hotte aspirante.

Les lamelles de cortex (400 mg de tissu) sont découpées en morceaux d'environ 1 x1 x 1mm et sont plongées dans un tampon de lyse cellulaire composé de β mercapto-éthanol 1.96% (Sigma) + sarkosyl 10% (Sigma) + guanidium thiocyanate 4M (Sigma). Après avoir homogénéiser l'ensemble, un volume de phénol acide/chloroforme/alcool isoamylique (SDS, Peypin, France) (62 :24 :1) est ajouté à ce mélange. Après une agitation vigoureuse puis une centrifugation de 30 min à 3000 tour.min⁻¹ (centrifugeuse Jouan GR4, 11, France), la phase aqueuse est récupérée. Les traces de phénol sont éliminées en ajoutant un volume de chloroforme/alcool isoamylique 24 :1 et après une nouvelle centrifugation, l'ARN contenu dans le surnageant est précipité à l'isopropanol pur (SDS) (1 volume) et à l'acétate de NaCl (3M, pH=8) (1/10 de volume) à -80°C.

Un lavage à l'éthanol 70% permet d'éliminer toutes traces de sels avant de suspendre l'ARN dans de l'eau désionisée.

La quantité d'ARN est appréciée par spectrophotométrie (Gene Quant II, Pharmacia Biotech) à 260 nm (1unité DO =40 μ g d'ARN) le rapport 260nm/280nm devant être compris entre 1.5 et 2 permet d'apprécier la pureté de l'ARN.

Dans un deuxième temps, la technique d'extraction d'ARNm par réactif TRIzol® (Sigma) a été utilisée.

c) *Transcription inverse (RT)*

◆ Principe :

La transcription inverse est une réaction qui permet la synthèse d'ADN complémentaire à partir de l'ARNm. Elle est catalysée par la transcriptase reverse qui est une ADN polymérase ARN dépendante.

◆ Protocole :

Deux microlitres d'héxanucléotides ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (oligopdN6) (Invitrogen, Life Technologies, Carsbald, CA, USA) servant d'amorces sont incubées à 65°C avec $10 \mu\text{g}$ d'ARN pendant 5 min.

Par la suite sont ajoutés : $0,5 \mu\text{l}$ (2UI) de RNase inhibitor (Applied Biosystems Foster city, CA, USA) + $2 \mu\text{l}$ (0.1M) DTT (Invitrogen) + $1 \mu\text{l}$ (10 mM chaque dNTP) de dNTPs (Applied Biosystems) + $4 \mu\text{l}$ de tampon 5X (Applied Biosystems) + $1 \mu\text{l}$ (200 UI) de Reverse transcriptase IM-MLV (Invitrogen) dans un volume finale de $20 \mu\text{l}$. L'ensemble incube pendant 1 heure à 37°C , puis 10 min à 70°C pour détruire la Reverse Transcriptase. Une précipitation identique à celle décrite pour l'extraction est réalisée suivie d'un lavage à l'éthanol 70% ce qui permet d'éliminer les produits de réactions de la RT.

Le culot d'ADN complémentaire (ADNc) obtenu est repris dans $50 \mu\text{l}$ d' H_2O désionisé.

d) *Amplification de l'ADNc par polymérase chain reaction (PCR)*

◆ Principe

C'est une méthode de synthèse d'ADN *in vitro* qui permet à un fragment d'ADN d'être amplifié en un grand nombre de copies au cours de cycles successifs.

Ce cycle se décompose en trois étapes toujours identiques :

- Séparation des brins complémentaires (dénaturation).
- Fixation d'amorces oligonucléotidiques complémentaires l'une en 5' et l'autre en 3' du fragment à amplifier.
- Elongation des amorces par la Taq polymérase.

Le nombre de copies de la séquence étant double à chaque cycle pour n cycles on obtient une amplification théorique exponentielle 2^n .

◆ Protocole :

Les amorces ont été choisies pour comprendre une région exon-intron-exon permettant de différencier les amplicons de l'ADNc de l'ADN génomique. Pour chaque PCR, un témoin négatif (eau) et un témoin positif (β actine) ont été utilisés.

A 10 μ l de solution d'ADNc précédent, est ajouté 1,5 μ l de $MgCl_2$ (50 mM) (Applied Biosystem Roche) + 1X de tampon de réaction de la Taq polymérase (Eurobio, Les Ulis, France) + 1 μ l de dNTPs (10 mM chaque dNTP, Applied Biosystems) + 1 μ l ($0.5 \mu g \cdot \mu l^{-1}$) de chaque amorce + 0,5 μ l (1,5 UI) de Taq Polymérase (Eurobio, les Ulis, France), au final une qsp H_2O de 50 μ l de est ajoutée.

L'échantillon est placé dans un thermocycleur (Perkin Elmer) dont la séquence du programme est la suivante :

- 94°C pendant 5 min
 - 95°C pendant 30 s : dénaturation
 - 62°C pendant 30 s : hybridation
 - 72°C pendant 30 s : élongation
 - 72°C pendant 10 min : élongation finale
- } Cycle répété 30 fois

2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR (5 µl chacun) sont séparés par migration électrophorétique à travers un gel d'agarose 1.5% contenant 1 mg.ml⁻¹ de bromure d'éthidium (BET, Invitrogen) dans un tampon TBE (Tris-HCl 10.8g. l⁻¹, acide borique 5.5g. l⁻¹, EDTA à 0.93 g.l⁻¹). Les échantillons ainsi que le marqueur de poids moléculaire de 1Kb (Invitrogen) sont mélangés avec du bleu de bromophénol avant d'être déposés dans les puits. Une migration de 50 mV est réalisée pendant 20 min. La position des fragments d'ADN ayant fixé le BET est révélée sous UV (310 nm) et le gel est photographié avec un système Baby Imager.

D. Immunolocalisation de GDF9/BMP15

L'objectif de ce marquage est de localiser GDF9, BMP15 et les récepteurs BMPRII et BMPRII.

◆ Principe de l'immunomarquage sur coupe de tissu

La préparation qui comporte la protéine à mettre en évidence est mise en contact avec une solution contenant l'anticorps dit primaire issu d'un animal immunisé contre l'antigène d'intérêt. L'anticorps primaire se fixe de façon spécifique à l'antigène. Après rinçage, l'excès d'anticorps est évacué ne laissant que les anticorps fixés. Ces anticorps peuvent être directement porteurs du marqueur (un fluorochrome ou une enzyme comme la peroxydase) ou vont être révélés par des anticorps secondaires eux même marqués. Les anticorps secondaires sont produits par l'immunisation d'un animal contre les anticorps primaires, cet animal étant issu d'une espèce différente de celle de la production des anticorps primaires. Les anticorps primaires fixés contre les antigènes vont à leur tour se comporter comme des antigènes et être fixés par des anticorps secondaires.

L'utilisation de cette technique dite indirecte permet d'amplifier le message : l'antigène peut porter plusieurs anticorps primaire, qui lui même est reconnu par plusieurs anticorps

secondaire. Il est possible d'amplifier encore le signal par un troisième niveau : dans un troisième temps d'incubation, l'anticorps secondaires lié à la biotine va fixer la streptavidine qui porte le marqueur et pour laquelle la biotine dispose d'une forte affinité.

La technique indirecte donne aussi la possibilité d'utiliser le même anticorps secondaire marqué, dirigé contre différents anticorps primaires produits chez la même espèce mais spécifiques d'un antigène.

◆ Protocole

Des coupes de 4 μm pour chaque hemi-ovaire issu de 5 brebis différentes ont été réalisées à J0, J7 et J15. Les coupes ont été montées sur des lames Starfrost® (Knittel Glaser, Braunschweig, Germany), séchées pendant 24 heures à 37°C, déparaffinées dans 3 bains successifs de methyl cyclohexane (Merck, Lyon, France), réhydratées avec une succession de bain décroissant d'éthanol (100%, 95%, 70%, Hexalab, Saint-Priest, France) et ensuite placées dans un tampon PBS (Sigma). Le démasquage antigénique a été réalisé par micro-ondes à 95°C pendant 15 minutes dans un tampon de citrate de sodium à 10 mM à pH=6 (Sigma). Après 2 lavages dans de l'eau désionisée, les peroxydases endogènes ont été bloquées en laissant incubées les lames déparaffinées avec du peroxyde d'hydrogène à 3 % (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) pendant 10 min à 37°C. Les lames sont ensuite lavées 2 fois dans du tampon PBS. Toutes les incubations suivantes sont réalisées à température ambiante dans une chambre noire humide.

Pour GDF9, les lames de tissu sont laissées incubées pendant 2 heures avec l'anticorps primaire (Santa Cruz Biotechnology Inc.) de chèvre anti- GDF9 humain à une concentration de 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les lames sont ensuite lavées 2 fois dans du tampon PBS et sont laissées incubées pendant 30 min avec l'anticorps secondaire anti-chèvre biotinylé (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Après 2 lavages dans du tampon PBS, les lames sont laissées incubées pendant 30 min avec le réactif HRP-streptavidin (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Avant la

dernière incubation, les lames sont lavées 2 fois à nouveau et sont ensuite colorées avec le complexe diamino-benzidine (Santa Cruz Biotechnology Inc.) pendant 10 min.

Pour BMP15, les lames sont laissées incubées 2 h avec l'anticorps primaire de lapin anti- BMP15 humain fourni par A. Gougeon à une concentration de $4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Après 2 lavages dans le PBS, les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin IgG conjugués à la peroxydase (EnVision DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Après 2 nouveaux lavages le complexe diamino-benzidine (DAB+: DakoCytomation) est appliqué sur les lames pendant 1 min.

Pour BMPRII et BMPRII, nous avons employé le protocole utilisé pour GDF9, avec des anticorps primaires de chèvre (Santa Cruz Biotechnology Inc) anti BMPRII humain à une concentration de $4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et anti BMPRII humain à une concentration de $4\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Après les incubations avec le complexe diamino-benzidine, 2 lavages dans de l'eau désionisée sont réalisées pour GDF9, BMP15, BMPRII et BMPRII; la contre coloration est effectuée avec de l'hématoxyline de Mayer diluée au 1:10 pendant 2 min. Au final, les lames sont lavées une dernière fois à l'eau désionisée et montées avec un milieu de montage aqueux « aqueous mounting medium » (DakoCytomation).

Pour le marquage non spécifique, les contrôles suivants ont été réalisés : la première incubation est réalisée avec le tampon de dilution des anticorps sans anticorps primaire ou avec des IgG de chèvre (Santa Cruz Biotechnology Inc.) non immunisée contre GDF9, ni BMPRII ni BMPRII, et du sérum de lapin non immunisé contre BMP15.

III. Culture in vitro tissu ovarien congelé / décongelé

A. Préparation du tissu ovarien

Chaque ovaire est découpé en deux dans du milieu X-vivo, la médullaire est retirée laissant une épaisseur de cortex de 1 mm ou de 0.5 mm selon les séries. Pour la congélation, les demi-ovaires sont coupés en deux pour faciliter leur introduction dans les paillettes de 1 ml (Cryobiosystem, Paris, France).

B. Préparation du milieu de congélation

Le milieu de congélation est préparé extemporanément.

Du milieu de culture BM-1 (Elios Bio Media, Paris, France) est supplémenté avec 10 % de Sérum de veau fœtal SVF (Sigma, St Louis, USA). Ce mélange sert de milieu de base auquel est rajouté le cryoprotecteur.

Pour chaque protocole, 5 hémiovaires issus de 5 brebis différentes sont ensuite placés dans 5 paillettes (Cryobiosystem, Paris, France) de 1ml préalablement remplies de milieu de congélation.

Au sein des paillettes, le tissu est laissé incubé pendant 10 min à température ambiante pour permettre une pénétration efficace du cryoprotecteur, puis les paillettes sont scellées à la chaleur.

C. Protocoles de congélation

a) Épaisseur du tissu congelé/décongelé

Partant de la technique de congélation du cortex ovarien, nous avons préparé le tissu avec une épaisseur de 0,5mm et nous avons utilisé un protocole de congélation utilisé

habituellement avec des cortex d'une épaisseur de 1mm utilisant le DMSO 2M. Après décongélation, les tissus ont été placés en culture pendant 4 jours.

N=5	Série 6	Série 7
cryoprotecteurs	DMSO 2M	DMSO 2M
épaisseur	0.5 mm	1mm
Nb de jours de culture	4 jours	4 jours

Tableau 4 : série de cultures de tissu congelé selon 2 épaisseurs de tissu

b) Nature des cryoprotecteurs

A partir de cortex d'une épaisseur de 1mm, deux protocoles de congélations ont été comparés en terme de survie à la décongélation. A partir de ces différents protocoles de congélation, nous avons mis en culture pendant 4 jours ces tissus après décongélation.

N=5	Série 7	Série 8
cryoprotecteurs	DMSO 2M	PROH(1,5M)+Sucrose 0,3M
épaisseur	1mm	1mm
Nb de jours de culture	4 jours	4 jours

Tableau 5 : series de cultures de tissu congelé selon 2 protocoles de congélation

c) Protocole de Congélation/décongélation

Un congélateur programmable (minicool 40 PC, air liquide Santé, France) est utilisé pour la descente en température.

Les protocoles de congélation sont basés sur les protocoles de congélation lente établis par Demirci en 1999. Les paillettes sont refroidies avec une première descente en température

de +20 °C (T1) à -35°C (T3) avec une vitesse de 2°C.min⁻¹(R1), puis une descente R3 de -35°C jusqu'à -150°C (T4) avec une vitesse de 25°.min⁻¹.

Pendant la première pente de descente en température, le « seeding » est déclenché à une température Tf (variable selon la nature et les concentrations en cryoprotecteur), un seeding semi-automatique étant réalisé par l'envoi de frigories (vapeur d'azote liquide) de -18°C (Tx).

Après le décalage thermique produit par le seeding, la descente en température reprend une vitesse R1 de 2°C.min⁻¹ à partir d'une température T2.

Quand la température a atteint -150°C, les paillettes sont plongées et stockées dans l'azote liquide à -196 °C.

Une décongélation rapide (1500 °C.min⁻¹) est effectuée dans un bain-marie à 37 °C.

Pour éliminer le cryoprotecteur les hemi-ovaires sont lavés 2 fois 5 min dans 2 bains successifs de BM-1 en agitant légèrement les fragments.

D. Mise en culture

Préparation des cortex :

Pour la culture les cortex sont découpés en lamelles de 5 x5 x 1 mm d'épaisseur ou de 5 x 5 x 0.5 mm d'épaisseur selon les protocoles

Le milieu de culture et les techniques de cultures sont les mêmes que pour le tissu frais.

E. Analyse histologique

Les techniques d'analyse histologiques et les caractéristiques morphologiques des follicules sont les mêmes que celles décrites précédemment pour la culture de tissu frais.

IV. Etude statistique

Les effectifs étant petits, nous avons réalisé les tests non paramétriques. Nous avons utilisé le logiciel de statistique Unistat (Unistat, London, GB).

Pour comparer les moyennes nous avons utilisé un test de Mann Whitney pour les séries non appariées et Wilcoxon pour les séries appariées. Lorsque nous avons plus de deux séries à comparer, nous avons réalisé une analyse de variance non paramétrique; le test de Kruskal-Wallis.

Un test X^2 a été utilisé pour comparer la distribution des follicules.

Les différences entre les groupes étudiés ont été considérées significatives pour un $p < 0,05$.

V. Récapitulatifs des différentes séries

N=5	Série 1	Série 2	Série 3
Epaisseur du cortex	0.5 mm	1 mm	1 mm
Nb de jours de culture	15 jours	4 jours	10 jours

Tableau 1 : séries de culture de tissu frais selon l'épaisseur du tissu

N=5	Série 4	Série 5
support	Millicell	Véro
Nb de jours de culture	10 jours	10 jours

Tableau 2 : séries de culture de tissu frais selon 2 supports

N=5	Série 6	Série 7
cryoprotecteurs	DMSO 2M	DMSO 2M
épaisseur	0.5 mm	1mm
Nb de jours de culture	4 jours	4 jours

Tableau 4 : série de cultures de tissu congelé selon l'épaisseur de tissu

N=5	Série 7	Série 8
cryoprotecteurs	DMSO 2M	PROH(1,5M)+Sucrose 0,3M
épaisseur	1mm	1mm
Nb de jours de culture	4 jours	4 jours

Tableau 5 : séries de cultures de tissu congelé selon 2 protocoles de congélation

RESULTATS

I. Culture in vitro : tissu ovarien frais

A. Etude de l'expression de GDF9/BMP15

1. Etude morphologique

Dans cette étude, pour l'ensemble des comptes effectués, concernant les 5 brebis et pour tous les jours de culture, 2348 follicules au total ont été examinés. Le pourcentage moyen des follicules primordiaux a chuté de 58.6% (J0) à 13.4% (J15) ($p < 0.01$), le pourcentage de follicules primaires est passé de 3.2% (J0) à 31,5% à J4 ($p < 0.01$), le taux restant stable jusqu'au 15e jour de culture (35,6%) (Tableau 6 et Figure 28). Le pourcentage moyen des follicules intermédiaires a augmenté passant de 23,1% (J0) à 31.4% à J7 ($p = \text{NS}$), puis a baissé pour atteindre 23,4% au 15e jour de culture. Le pourcentage de follicules atrétiques a augmenté de façon croissante jusqu'au 15e jours de culture, de 14,7% (J0) à 27,1% (J15) ($p < 0.05$). De rares follicules secondaires ont été observés, aucun à J7 et J15, et représentant seulement 0,5%, 1,1%, 1,0%, et 2,1% de l'ensemble des follicules pour J0, J2, J4 et J10 respectivement. La structure histologique des follicules est montrée sur la figure 29.

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	58.6 (±3.1)	218	23.1 (±4.0)	87	3.2 (±1.7)	12	0.5 (±0.3)	2	14.5 (±1.8)	54
J2	33.5 (±4.5)	151	35.3 (±5.8)	174	12.0 (±3.1)	51	1.1 (±0.4)	4	18.1 (±3.1)	75
J4	21.2 (±3.1)	76	29.1 (±6.0)	109	31.5 (±5.8)	101	1.0 (±0.6)	3	17.2 (±1.3)	58
J7	15.9 (±1.9)	55	31.4 (±1.9)	110	31.1 (±2.0)	109	0.0 (±0.0)	0	21.5 (±2.6)	74
J10	14.3 (±1.2)	55	28.6 (±2.3)	111	32.7 (±1.6)	126	2.1 (±0.9)	8	22.3 (±2.3)	84
J15	13.4 (±0.7)	59	23.9 (±1.7)	106	35.6 (±2.2)	156	0.0 (±0.0)	0	27.1 (±2.5)	120

Tableau 6 : série 1, tissu frais, épaisseur de 0,5 mm, pourcentage moyen (±sem) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes.

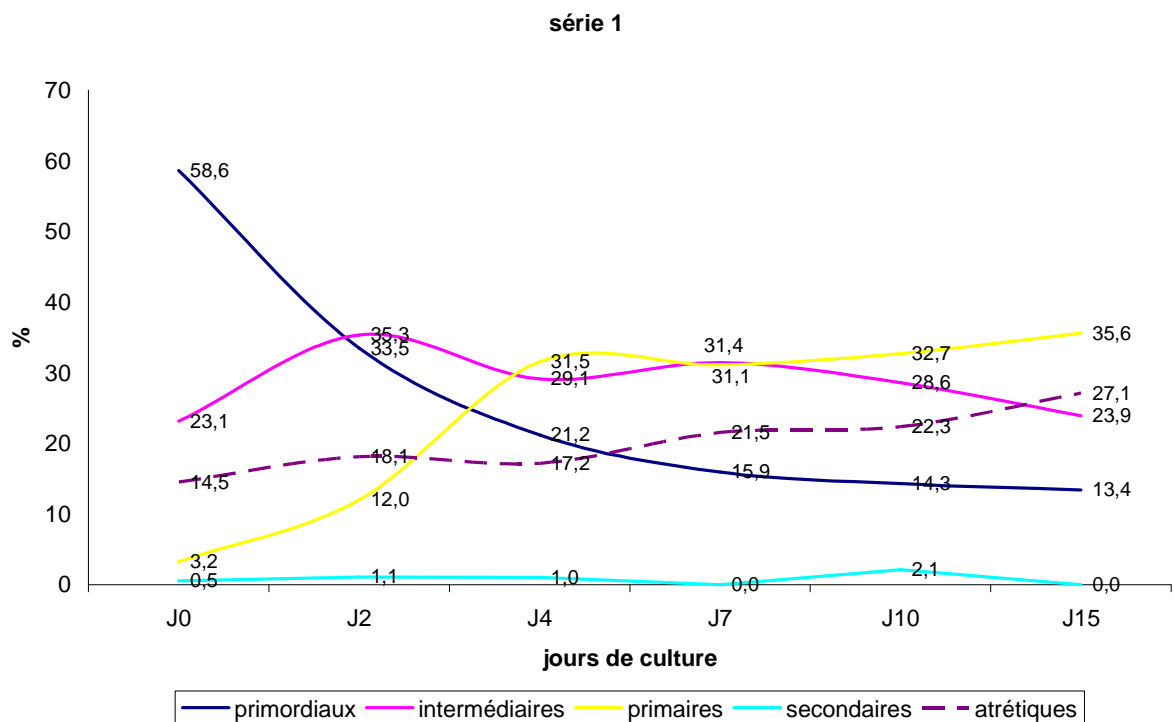


Figure 28 : série 1 : culture de tissu frais, épaisseur de cortex de 0,5 mm, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrétiques pour 15 jours de culture..

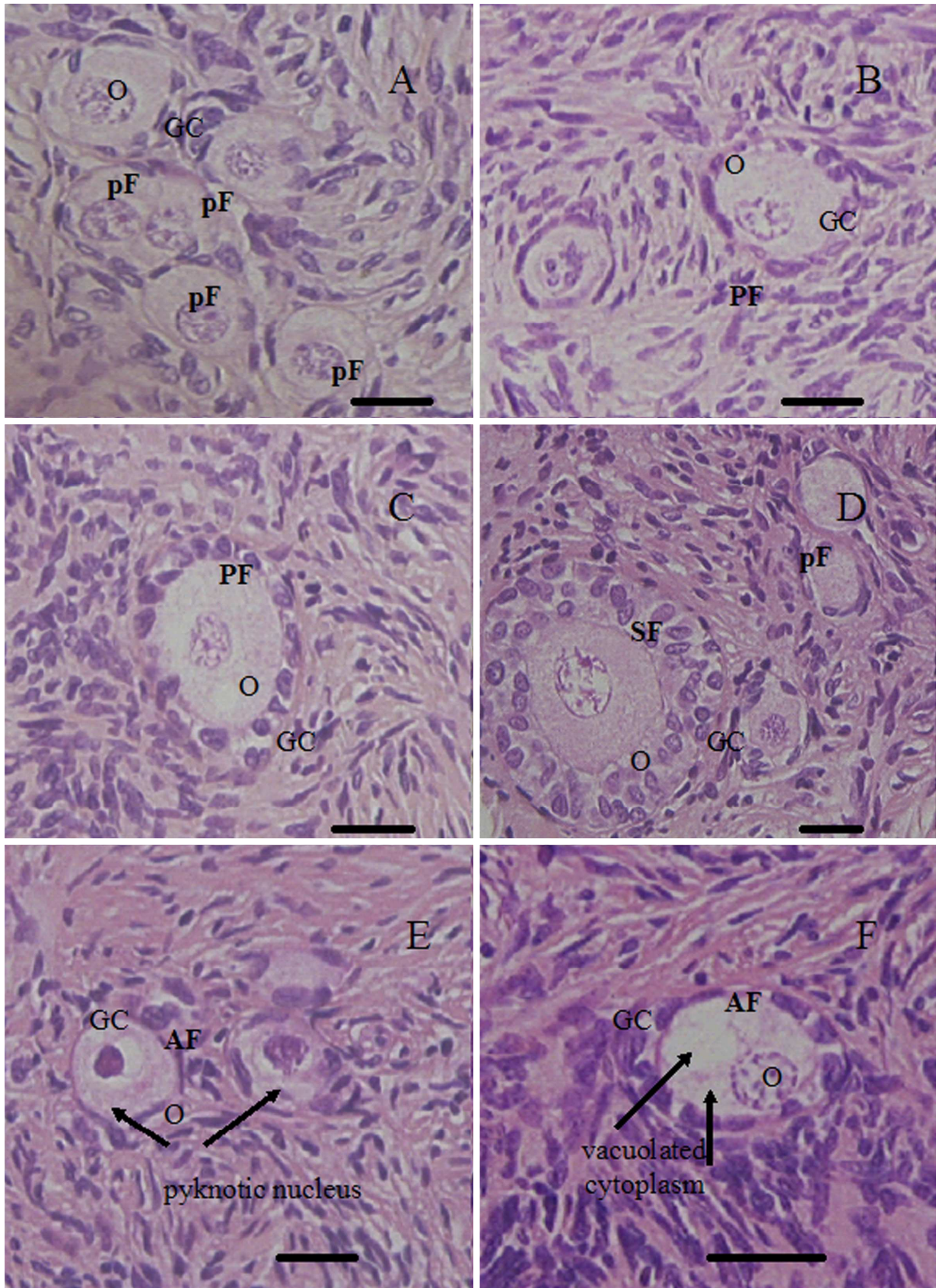


Figure 29 : aspect morphologique de follicules ovariens (coloration HPS). Follicule primordial (A), follicule primaire (B,C), follicule secondaire (D), follicules atrétiques (E,F), noyau pycnotique (E) et vacuoles cytoplasmiques (F). pF, follicule primordial, PF, follicule primaire, SF, follicule secondaire, AF follicule atrétique ; O ovocytes, GC, granulosa cellules, barre d'échelle = 20 μ m.

2. RT-PCR

Avant la culture (J0), au 7^e jour et jusqu'au quinzième jours de culture, la présence de l'ARN messager de *gdf 9* et de *bmp 15* a pu être mis en évidence. Pour les 5 brebis, un même profil de gel d'électrophorèse a été retrouvé. Une bande de 586 pb pour *gdf 9* et une bande de 483 pb pour *bmp 15* ont été retrouvées pour les 3 temps de culture (Figure 30).

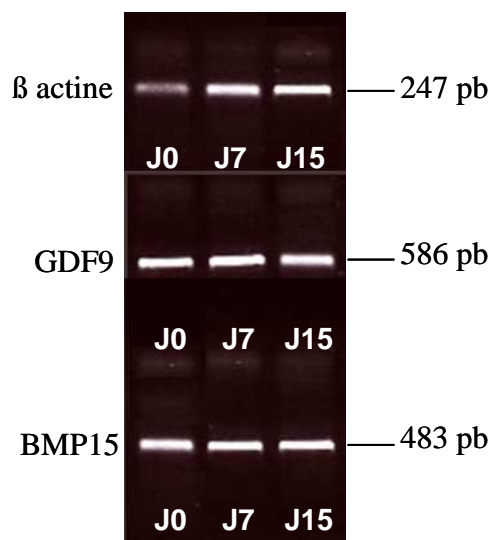


Figure 30 : expression de *gdf 9*, *bmp 15* et le contrôle positif β actine durant la culture sur un gel représentatif. *bmp 15* et *gdf 9* sont exprimés à J0, J7 et J15.

a) Immunolocalisation de GDF9 et BMP15

Les différentes coupes obtenues à partir des 5 brebis ont montré un tissu contenant des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, et de rares secondaires. Avant la mise en culture (J0), les différents types folliculaires, en majorité représenté par des follicules primordiaux, ont montré un marquage pour GDF9 et BMP15 dans le cytoplasme des ovocytes figure 4. Au 7^e et au 15^e jour, nous retrouvons les différentes classes folliculaires avec une

distribution modifiée par rapport à J0, et de façon identique à J0, un marquage pour GDF9 et BMP15 a été retrouvé dans le cytoplasme des ovocytes des différents types folliculaires (Figure 31). Les témoins négatifs ont montré une absence de marquage.

Nous mettons donc en évidence l'expression de GDF9 et BMP15 en culture.

3. Immuno localisation de BMPRII et BMPRI

À J0, les différents types folliculaires ont montré un marquage dans le cytoplasme des ovocytes. Nous avons également retrouvé un marquage dans le cytoplasme des cellules endothéliales des vaisseaux (capillaires). Pour J7 et J15 nous avons observé un marquage dans le cytoplasme des ovocytes des différents types folliculaires (primordiaux et primaires) et dans les cellules endothéliales. Aucun marquage n'a été retrouvé pour les différents témoins négatifs. Les récepteurs sont bien présents en culture aux différents jours étudiés (Figure 31).

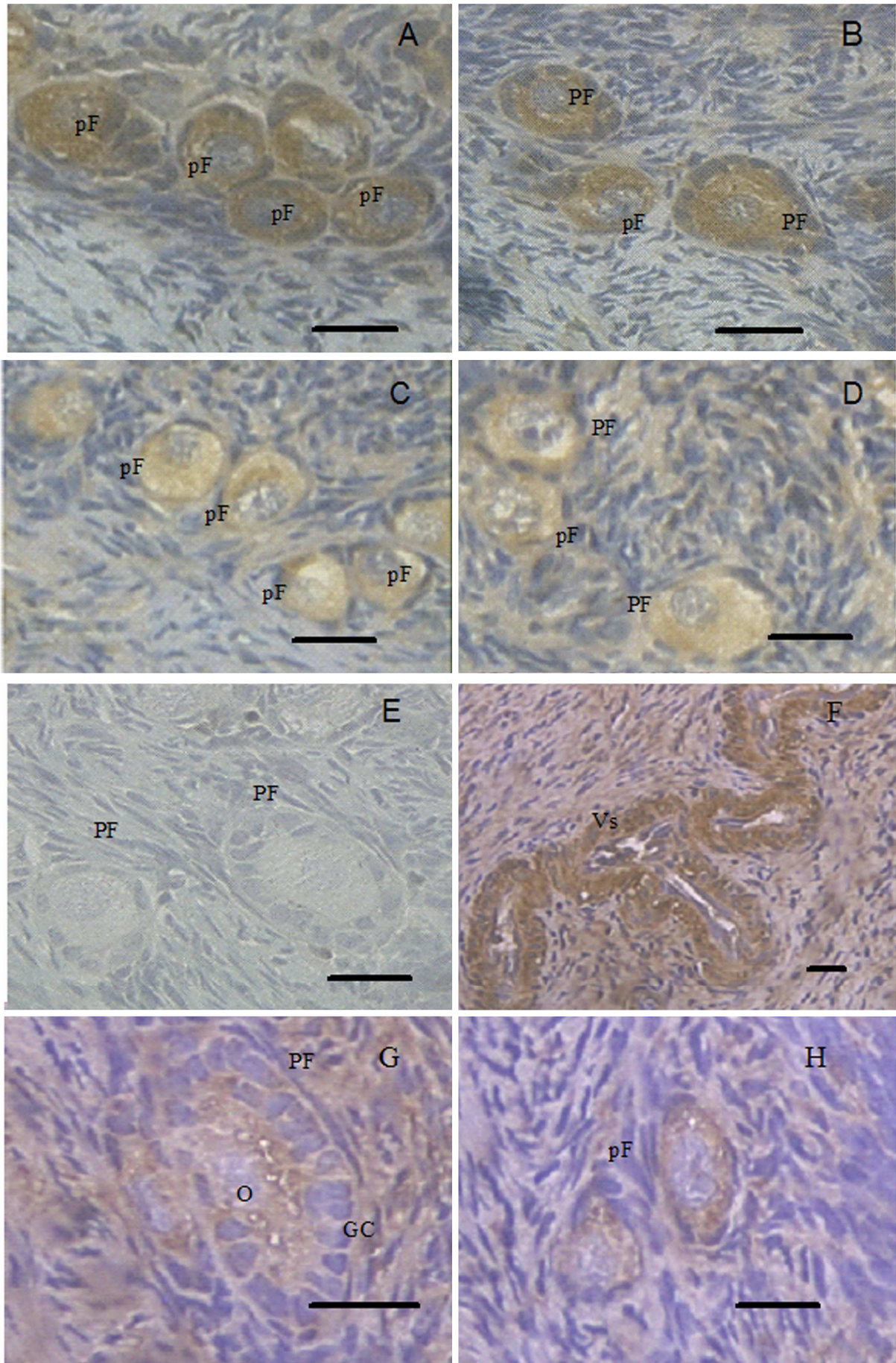


Figure 31 : immunoréactivité de BMP15, GDF9, BMPRI1 et de BMPRII sur du tissu ovarien de brebis. Immunomarquage positif pour BMP15 à J0 (A) et J7 (B). Immunomarquage positif pour GDF9 à J0 (C) et J15 (D), et un contrôle négatif (E). Immunomarquage positif pour BMPRI1 à J0 (F) et J7 (G). Immunomarquage positif pour BMPRII à J15 (H). pF, follicule primordial, PF, follicule primaire, SF follicule secondaire, O ovocytes, GC, cellules de la granulosa, Vs, vaisseaux, la barre d'échelle représente 20 μm.

B. Étude de l'influence de l'épaisseur du cortex sur la culture

Nous avons comparé l'évolution en cultures des lamelles de cortex d'une épaisseur de 1 mm pour une surface de 5 x 5 mm à des lamelles d'une épaisseur de 0.5 mm pour une surface de 5 x 5 mm.

a) Série 1 : cortex ovarien d'épaisseur 0,5 mm cultivé 4 jours

Cf résultats Tableau 6, Figure 28.

b) Série 2 : cortex ovarien d'épaisseur 1 mm cultivé 4 jours

Une série de culture (série 2, N=5) (Tableau 7 et Figure 32) pour des lamelles de 1mm d'épaisseur a été effectuée jusqu'à 4 jours. De J0 à J4 le nombre de follicules primordiaux a chuté : 77,1% à J0 vs 30,6% à J4, $p < 0,01$. Les proportions de follicules intermédiaires et primaires ont augmenté : 11,0 et 2,7% à J0 vs 39,5 et 13,8% à J4, $p < 0,01$ et $p < 0,05$ respectivement.

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	77,1 (±5,0)	530	11,0 (±3,4)	69	2,7 (±0,8)	17	1,2 (±0,7)	7	8,0 (±2,7)	55
J2	49,5 (±7,4)	307	25,6 (±5,3)	154	5,6 (±3,2)	32	0,3 (±0,19)	2	19,0 (±1,8)	119
J4	30,6 (±5,5)	285	39,5 (±4,1)	302	13,8 (±4,3)	94	0,1 (±0,1)	1	16,0 (±2,6)	143

Tableau 7 : série 2, épaisseur de tissu 1mm, pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes.

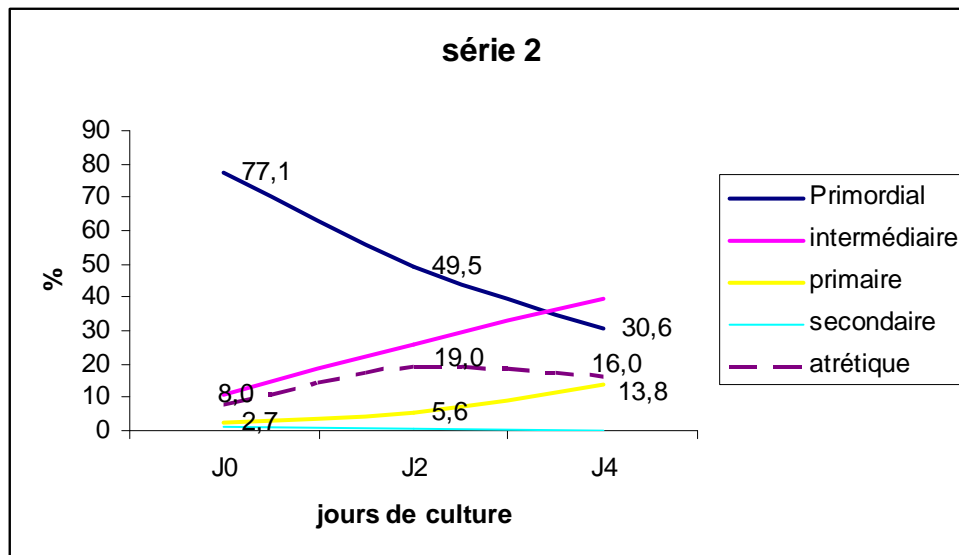


Figure 32 : Série 2, tissu frais, épaisseur 1mm, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrétiques pour 4 jours de culture.

c) Série 3 : cortex ovarien d'épaisseur 1 mm cultivé 10 jours

Une seconde série de culture pour des lamelles de 1 mm (série 3) (Tableau 8 et Figure 34) a été réalisée afin de vérifier nos premiers résultats mais cette fois-ci la culture a été poursuivie pendant 10 jours. De J0 à J4 le nombre de follicules primordiaux a chuté : 50,0% à J0 vs 14,3 à J4 $p < 0,01$. Les proportions de follicules intermédiaires et primaires ont augmenté : 16,2% et 8,1 % à J0 vs 33,9 et 11,2 % à J4, $p < 0,01$ et $p = \text{NS}$ respectivement. Ensuite de J4 à J10, l'ensemble des différents types de follicules chute au profit d'une augmentation des follicules atrétiques, 25,5% à J0 vs 38,0% à J4 vs 73,6% à J10 $p < 0,01$.

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	50,0(±2,2)	197	16,2 (±3,90)	65	8,1 (±2,9)	31	0,2 (±0,2)	1	25,5 (±4,7)	100
J2	18,8(±6,5)	56	26,4 (±6,94)	81	19,6 (±7,7)	60	0,7 (±0,3)	2	34,4 (±20,6)	112
J4	14,3 (±5,4)	40	33,9 (±13,1)	85	11,2 (±8,3)	27	2,5 (±1,7)	6	38,0 (±18,1)	130
J7	17,9(±5,3)	62	19,6 (±11,1)	62	13,8 (±6,3)	43	1,5 (±0,9)	5	47,1 (±19,7)	175
J10	13,4 (±1,8)	42	9,6(±3,9)	31	3,3 (±1,5)	11	0,0 (±0,0)	0	73,6 (±3,3)	231

Tableau 8 : Série 3, épaisseur de tissu 1mm, pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes.

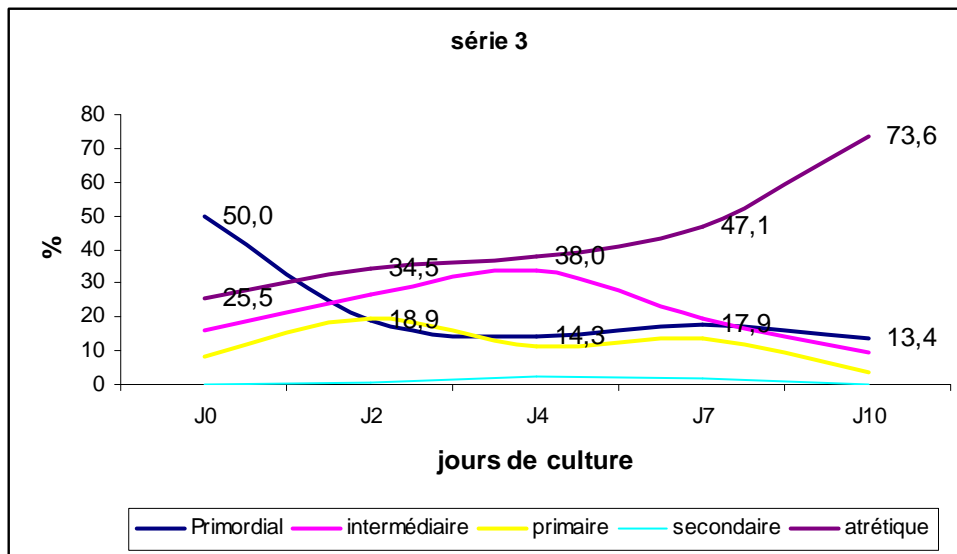


Figure 33 : Série 3, tissu frais, épaisseur 1mm, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrophiques durant 10 jours de culture.

d) Etude comparative entre les séries 2 et 3 de cortex de 1mm d'épaisseur

A J4, aucune différence significative n'a été mise en évidence (Figure 35). Cependant pour la série 3 l'atrésie se majore à chaque jour de culture avec une nette augmentation du pourcentage moyen de follicules atrophiques de J4 à J10, 38,0% vs 73,6% $p < 0,01$. Ces résultats ont été retrouvés pour d'autres cultures (données non montrées).

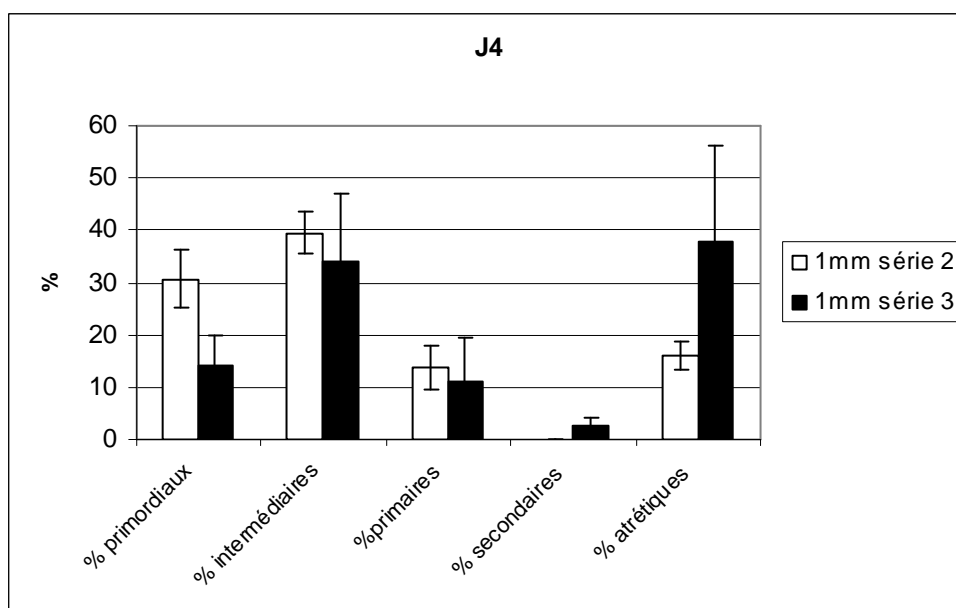


Figure 34 : comparaison des pourcentages moyens à J4 entre la série 2 et la série 3, tissu frais de 1mm, *p <0,05.

e) Etude comparative entre les cortex de 0,5mm d'épaisseur (série 1) et les cortex de 1mm d'épaisseur (série 2 et 3)

Entre la série 1 et la série 2, la comparaison des pourcentages moyens des différents types de follicules que ce soit à J0, J2 et J4, ne montre pas de différence significative. Le pourcentage de follicules primaires avec 1 mm d'épaisseur est tout de même plus bas à J4 par rapport à celui de 0,5 mm (31,5 vs 13,8%, p=NS) (Figure 33).

Entre la série 1 et la série 3, de J0 à J4 aucune différence significative n'a été mise en évidence, cependant à J7 et J10 le pourcentage de follicules atériques a augmenté significativement (73,6% à J10 avec 1mm d'épaisseur vs 29,25% pour 0,5 mm d'épaisseur, p<0,05) et parallèlement les taux de follicules primaires, et intermédiaires ont diminué significativement dans cette seconde culture (3,3% vs 34,7% p<0,05, 9,6% vs 23,0% p<0,05, respectivement) (Figure 36).

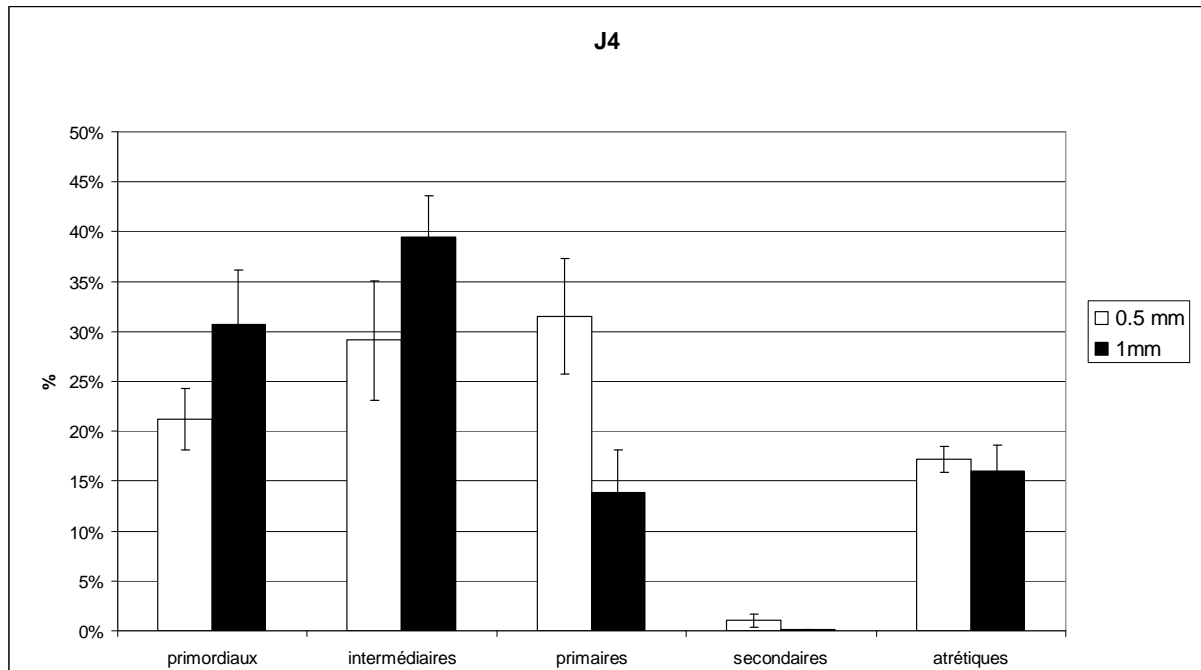


Figure 35 : comparaison des pourcentages moyens à J4, série 1, tissu frais de 0,5 mm vs série 2, tissu frais de 1mm, *p <0,05.

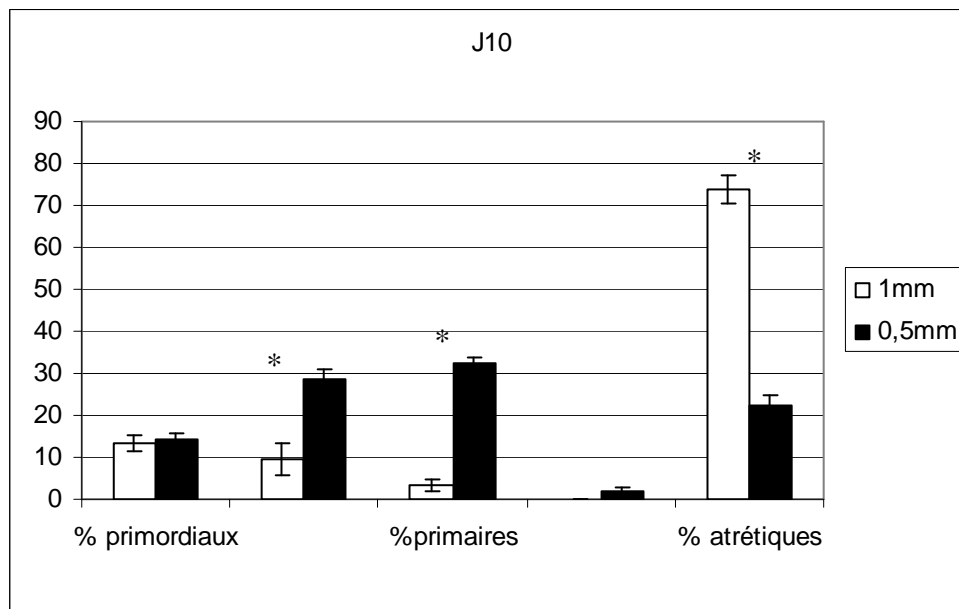


Figure 36 : comparaison des pourcentages moyens à J10 entre la série 1 tissu frais de 0,5 mm vs série 3 tissu frais de 1mm, *p <0,05.

C. Étude de l'influence du support sur la culture

1. Support millicel®

Pour la culture sur support « millicel® » série 4, les résultats observés sont comparables aux résultats de nos précédentes cultures. Le taux des follicules atrétiques est stable tout au long de la culture : 11,0 % à J0 vs 20,0% à J10 p=NS. On note une baisse du taux des follicules primordiaux de 68,4% à J0 vs 29,5% à J10 p=NS, une augmentation significative du taux des follicules intermédiaires de 12,1% à J0 vs 25,2% à J10 p<0,05 et une augmentation significatives du taux des follicules primaires de 7,8% à J0 vs 20,4% à J10 p<0,05. Peu de follicules secondaires sont retrouvées : 0,79% à J0 à 0,51 % à J10 p=NS (Tableau 9 et Figure 37).

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	68,4 (±10,5)	576	12,1(±6,2)	46	7,8(±2,7)	40	0,8(±0,3)	7	11,0(±3,3)	79
J2	30,6(±5,0)	333	38,3(±3,0)	354	11,2(±2,2)	103	1,4(±0,9)	8	13,2(±4,7)	173
J4	32,0(±6,3)	160	37,1(±3,4)	161	15,6(±3,7)	75	0,5(±0,5)	2	14,8(±3,4)	67
J7	21,2(±5,9)	102	31,9(±2,0)	130	16,9(±4,6)	63	0,6(±0,6)	2	29,4(±5,0)	100
J10	29,5(±3,3)	134	25,2(±1,8)	137	20,4(±3,1)	124	0,5(±0,4)	3	19,9(±5,5)	123

Tableau 9 : Série 4, support filtre millicel, pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes sur 10 jours de culture.

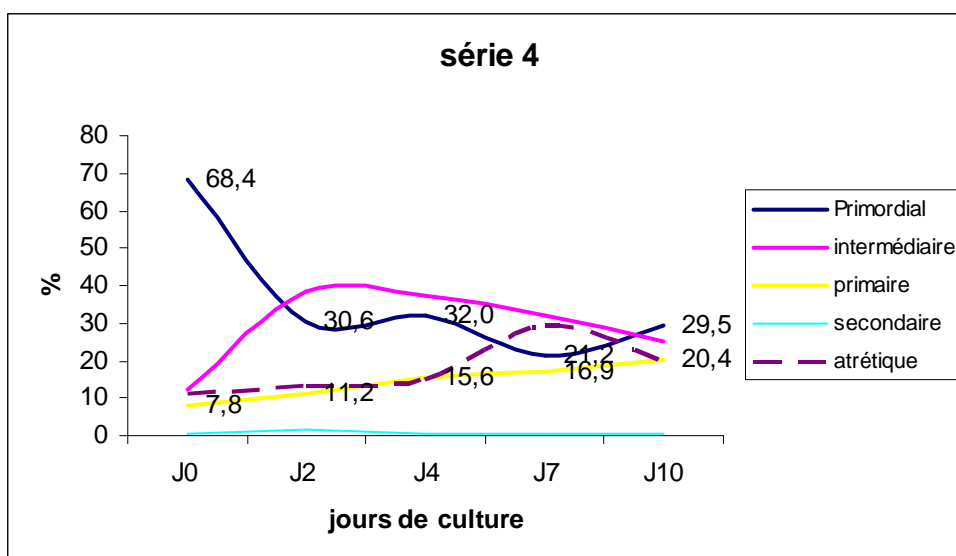


Figure 37 : Série 4, tissu frais, support filtre millicel, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrétiques pour 10 jours de culture.

2. Support cellules Véro

Pour la culture sur cellules Véro, série 5, à l'examen microscopique, les tapis cellulaires n'ont pas montré pas de signe de lyse, les milieux n'ont pas montré de signe d'hyperconsommation. Comme pour le support millicel, les lamelles de cortex n'ont pas adhéré aux cellules Véro. Au 2e jour de culture, une baisse de la population des follicules primordiaux est observée, 78,9% à J0 vs 13,7% à J2 p=NS, avec une augmentation des follicules intermédiaires et primaires : 5,9% vs 25,8% p=NS ; 5,2% vs 9,1% p=NS pour J0 et J2 respectivement. Peu de follicules secondaires sont comptés, 0,99% pour J0 à 1,04% à J2 p=NS. Ceci est associé à une augmentation du taux de follicules atrétiques de 8,9% à J0 vs 50,3% à J2 p=NS. Les résultats des jours de culture suivant sont dominés par la forte proportion des follicules atrétiques 8,9% à J0 vs 90,4% à J10 p<0,01 avec une baisse significative des autres populations folliculaires. (Tableau 10 et Figure 38).

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	79,0 (±3,0)	575	6,0 (±1,3)	42	5,2 (±0,7)	38	1,0 (±0,3)	7	8,9 (±3,8)	75
J2	13,7 (±9,1)	26	25,8 (±4,9)	82	9,1 (±3,3)	44	1,0 (±1,0)	1	50,3 (±6,0)	172
J4	8,8 (±1,8)	21	14,9 (±2,5)	33	3,0 (±1,3)	7	0,5 (±0,5)	1	72,8 (±5,6)	149
J7	10,8 (±4,1)	10	4,6 (±1,8)	5	2,0 (±1,1)	2	0,0 (±0,0)	0	82,6 (±2,1)	81
J10	6,8 (±2,7)	6	1,9 (±1,1)	2	0,9 (±0,9)	1	0,0 (±0,0)	0	90,4 (±3,0)	86

Tableau 10 : Série 5, support cellules Véro, pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes sur 10 jours de culture.

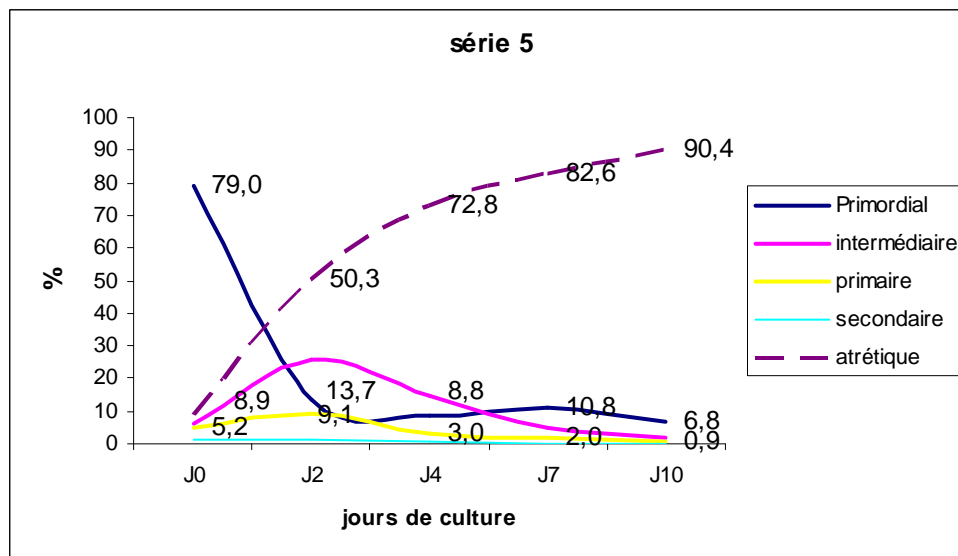


Figure 38 : Série 5, tissu frais, support cellules Véro, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrétiques sur 10 jours de culture.

3. Comparaison support filtre millicell® et cellules Véro

Entre les 2 supports, les populations de départ sont comparables à J0. À partir du 2e jour de culture, des moins bons taux de survie sont retrouvés pour le support Véro par rapport au support milli, 50,3% de follicules atrétiques vs 13,2 % $p < 0,05$. Pour le support Véro ce taux se majore à chaque jour de culture pour atteindre 90,4% au 10e jour contre 19,9% pour le support « millicel » $p < 0,05$.

II. Culture in vitro : tissu ovarien congelé/décongelé

A. Influence de l'épaisseur du tissu congelé/décongelé

1. Série 6 : cortex ovarien de 0,5mm d'épaisseur congelé avec DMSO 2M

À partir du protocole DMSO 2M (Demirci et al., 2001) utilisé pour des cortex d'une épaisseur de 1mm, nous avons modifié l'épaisseur des lamelles de cortex à congeler, pour les porter à 0,5 mm, épaisseur utilisé pour la culture.

Nous avons mis en culture pendant 4 jours, cette série après décongélation, série 6 (Tableau 11 et Figure 39).

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0 a	76,0 (±4,3)	487	10,6 (±2,5)	64	1,4 (±0,4)	9	0,6 (±0,4)	4	11,4 (±2,5)	75
J0 d	64,3 (±6,7)	1137	5,5 (±1,4)	90	0,6 (±0,2)	10	0,3 (±0,1)	5	29,3 (±5,8)	589
J2	13,4 (±7,8)	158	6,8 (±3,0)	69	0,7 (±0,3)	5	0,0 (±0,0)	0	79,1 (±10,7)	532
J4	5,4 (±2,4)	37	4,46 (±4,0)	41	0,4 (±0,2)	3	0,0 (±0,0)	0	89,80 (±6,3)	481

Tableau 11 : série 6, protocole DMSO 2M, épaisseur de 0,5 mm, pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes avant congélation, après décongélation et sur 4 jours de culture.

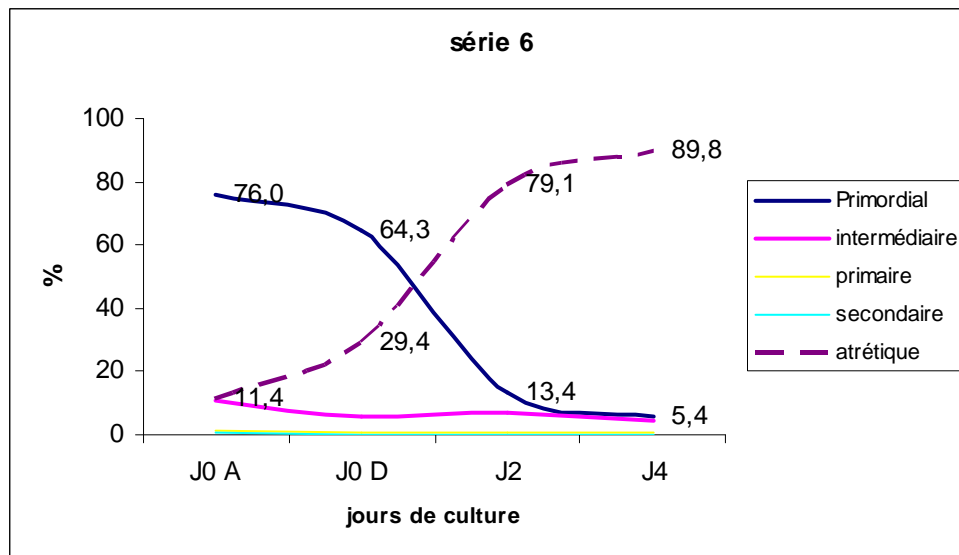


Figure 39 : Série 6, protocole DMSO 2M, épaisseur de 0,5 mm, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrophiques, avant congélation , après décongélation et sur 4 jours de culture.

Avant (J0A) et après décongélation (J0D), les populations folliculaires sont comparables, sauf pour les follicules atrophiques plus nombreux significativement, 11,4% vs 29,3% après décongélation $p < 0,01$. Pour cette série 6, pendant la culture nous observons une baisse du taux des follicules primordiaux, 64,2% à J0D vs 3,5% à J4 $P < 0,01$. Le taux de follicules intermédiaires et primaires chutent également, 5,5% et 0,6% à J0D vs 0,9 et 0,2% à J4 respectivement $p = \text{NS}$. Le taux de follicules atrophiques en parallèle augmente de façon significative de 29,3 à J0D vs 89,8% à J4 $p < 0,01$.

2. Série 7 : cortex ovarien de 1mm d'épaisseur congelé sous DMSO 2M

À partir du protocole de congélation DMSO 2M (Demirci et al., 2001) et après décongélation, nous avons conservé une épaisseur de 1 mm pour les lamelles de cortex pour les placer en culture (Tableau 12 et Figure 40).

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0 a	56,5 (±14,1)	469	15,3 (±1,9)	129	7,5 (±3,7)	62	0,1 (±0,0)	0	20,7 (±10,0)	174
J0 d	51,6 (±13,4)	684	13,1 (±2,7)	147	2,6 (±0,8)	27	0,5 (±0,1)	1	32,7 (±12,6)	360
J2	15,9 (±6,6)	101	12,9 (±3,4)	97	6,2 (±4,4)	63	0,1 (±0,3)	4	64,5 (±10,5)	391
J4	9,1 (±1,6)	86	17,1 (±4,4)	166	11,8 (±3,5)	114	0,0 (±0,1)	1	61,9 (±8,8)	492

Tableau 12 : série 7, protocole DMSO 2M, épaisseur de 1 mm, pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes avant congélation, après décongélation et sur 4 jours de culture.

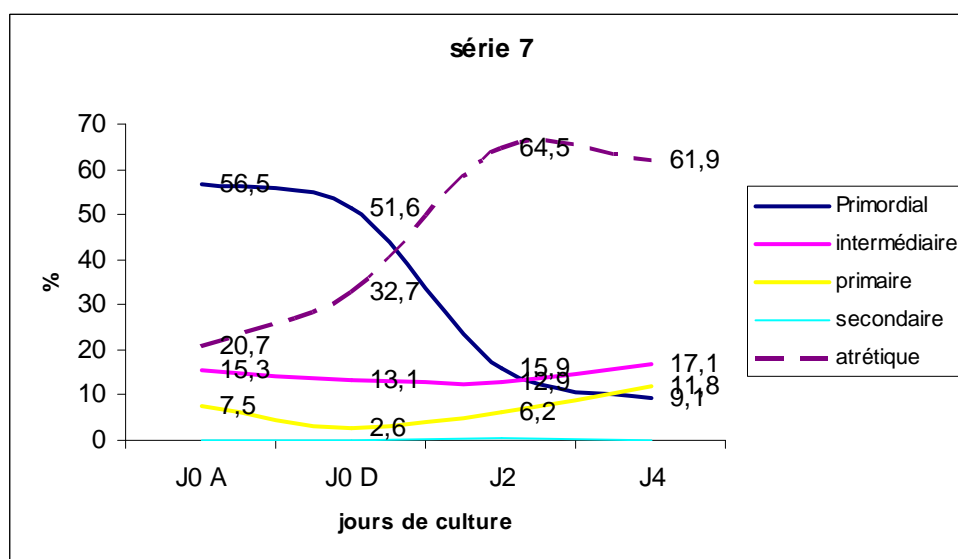


Figure 40 : Série 7, protocole DMSO 2M, épaisseur de 1 mm, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrétiques, avant congélation, après décongélation et sur 4 jours de culture.

Pour la série 7, les populations folliculaires sont comparables avant et après congélation. En culture, le taux de follicules primordiaux baisse de 51,6% à J0D vs 9,1% à J4 $p < 0,05$, celui des follicules intermédiaires et primaires augmentent ; 13,1% et 2,6% à J0D vs 17,1% et 11,8% à J4 respectivement $p = NS$. Le taux des follicules atrétiques croît également 32,7% vs 61,9% à J4 $p = NS$.

3. Etude comparative entre série 6, DMSO 2M et 0,5mm et série 7, DMSO 2M et 1mm

Nous avons comparé les populations folliculaires à J2 et J4 selon les 2 épaisseurs de cortex. A J2 aucune différence significative n'est observée, à J4 le pourcentage moyen de follicules primaires obtenu est plus élevé dans nos culture avec 1mm d'épaisseur par rapport à l'épaisseur de 0,5mm (11,8% vs 0,4%, $p < 0,01$) et nous avons moins de follicules atrétiques sans être significatif (61,9 % vs 89,8% pour 0,5mm, $p = \text{NS}$) (Figure 41).

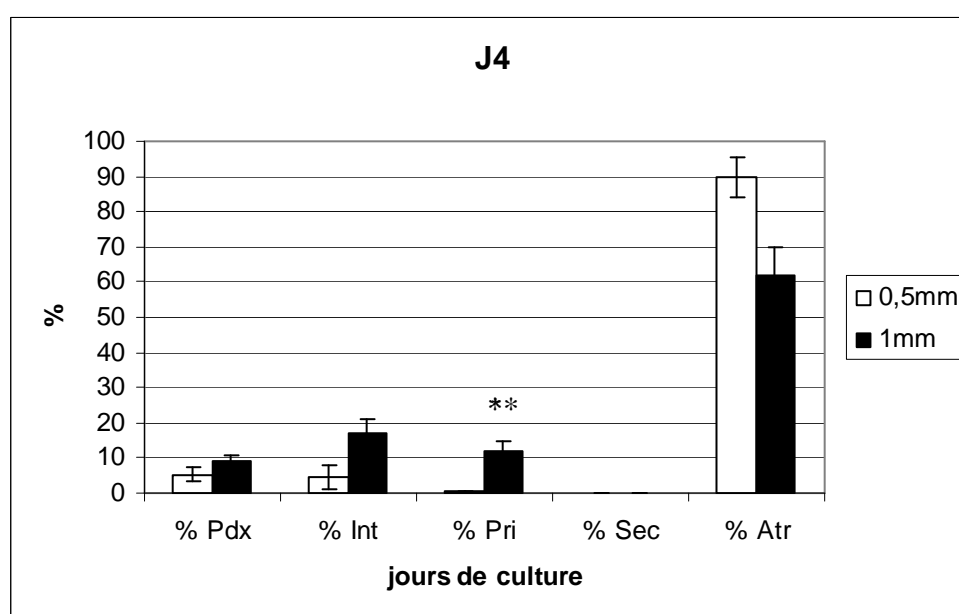


Figure 41 : comparaison des pourcentages moyens à J4 entre la série 6 et la série 7. $**p < 0,01$.

B. Influence de la nature des cryoprotecteurs

1. Série 7 : cortex ovarien de 1mm d'épaisseur congelé sous DMSO 2M

Cf résultats Tableau 12, Figure 40.

Comme déjà décrit précédemment, les populations folliculaires sont comparables avant et après décongélation (Figure 44).

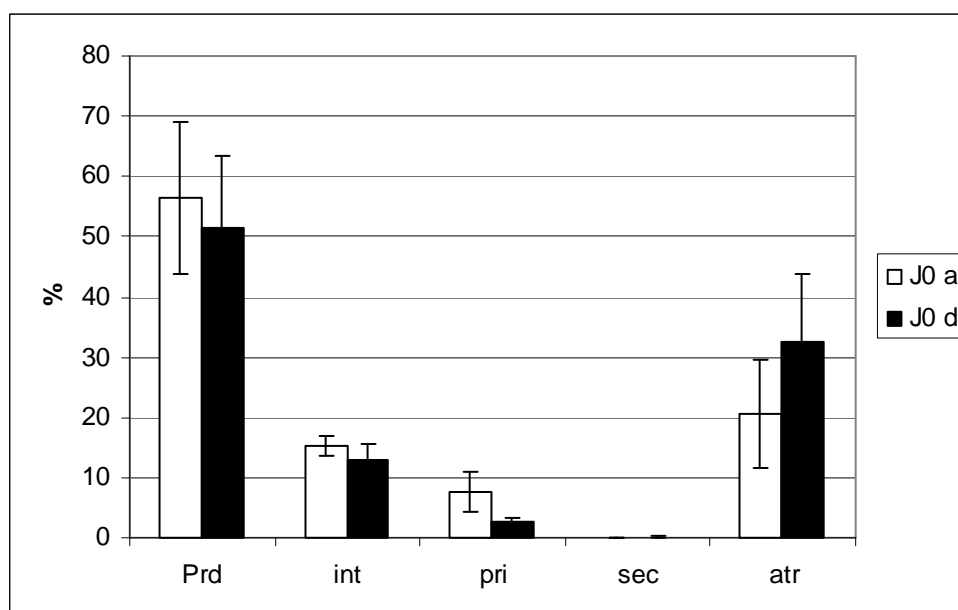


Figure 44 : comparaison avant congélation et après décongélation des populations folliculaires pour la série 7.

2. Série 8 : cortex ovarien de 1mm d'épaisseur congelé sous PROH 1,5M + sucrose 0,3M

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0 a	46,8(±15,4)	264	19,5(±5,1)	73	15,5(±14,1)	50	5,4(±4,4)	6	12,8(±3,9)	43
J0 d	30,4(±12,4)	266	26,3(±7,0)	148	11,7(±13,4)	50	0,7(±0,5)	2	31,0(±5,7)	168
J2	6,3(±1,6)	38	8,2(±2,5)	48	3,4(±6,6)	19	1,0(±0,6)	5	81,1(±4,2)	501
J4	4,4(±1,6)	33	4,72(±2,3)	35	3,52(±1,6)	24	1,1(±1,2)	4	86,3(±6,0)	503

Tableau 13 : série 8, protocole PROH+sucrose, épaisseur de 1 mm, pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus de 5 brebis différentes avant congélation, après décongélation et sur 4 jours de culture.

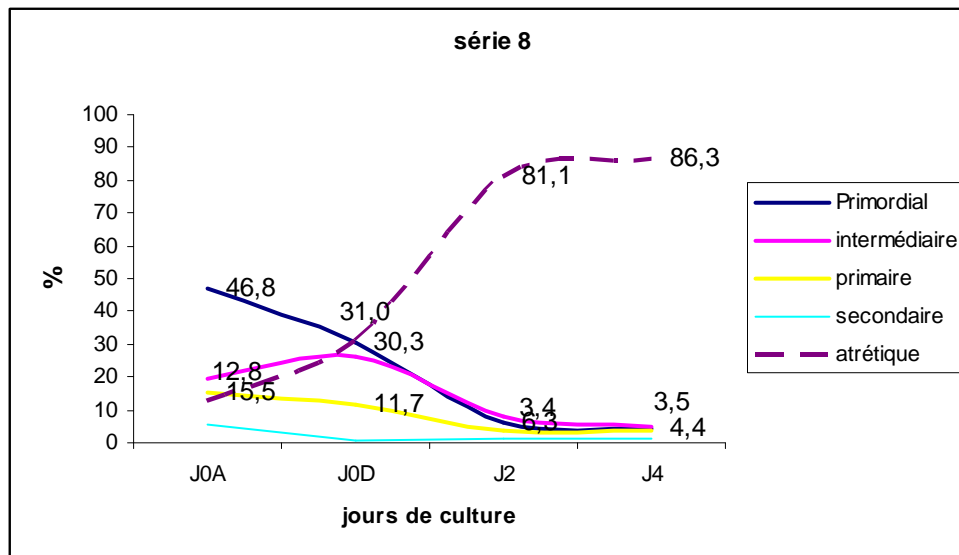


Figure 42: Série 8, protocole PROH+sucrose, épaisseur de 1 mm, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrophiques, avant congélation, après décongélation et sur 4 jours de culture.

Avant et après congélation pour le protocole PROH+sucrose, les populations folliculaires sont comparables sauf pour les follicules atrophiques qui ont montré une augmentation significative (12,8% vs 31,0%, $p < 0,05$) (Figure 43). On note une baisse du taux des follicules primordiaux et intermédiaires 30,3% et 26,3% à J0D vs 4,4% et 4,7% à J4, $p < 0,05$ et $p < 0,01$ et une baisse de celui des primaires 11,7% à J0D vs 3,3% à J4, $p = \text{NS}$. En parallèle le taux des follicules atrophiques augmentent passant de 31,0% à J0D à 86,3% pour J4 $p < 0,01$.

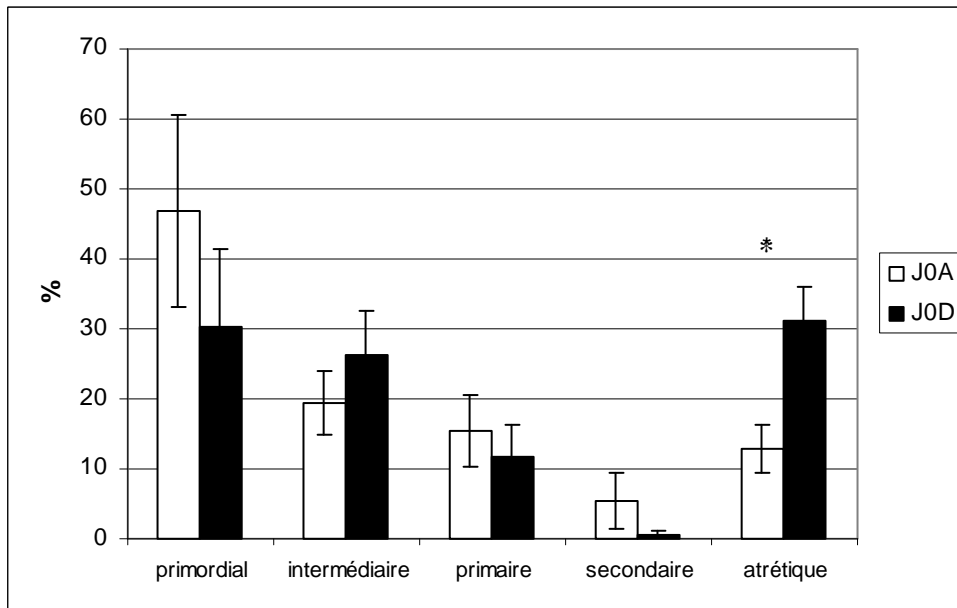


Figure 43 : comparaison avant congélation et après décongélation des populations folliculaires pour la série 8, PROH 1,5M+ sucrose 0,3M, *p<0,05

3. Etude comparative des deux protocoles de congélation DMSO 2M et PROH 1,5M

Après 4 jours de culture :

La comparaison des 2 populations à J4 montre de façon significative un plus grand pourcentage de follicules atreétiques pour le protocole PROH+sucrose par rapport au protocole DMSO 2M (86,3 % vs 61,9%, p<0,05) et une baisse non significative des autres populations folliculaires (primordiaux, intermédiaires, primaires) (Figure 45).

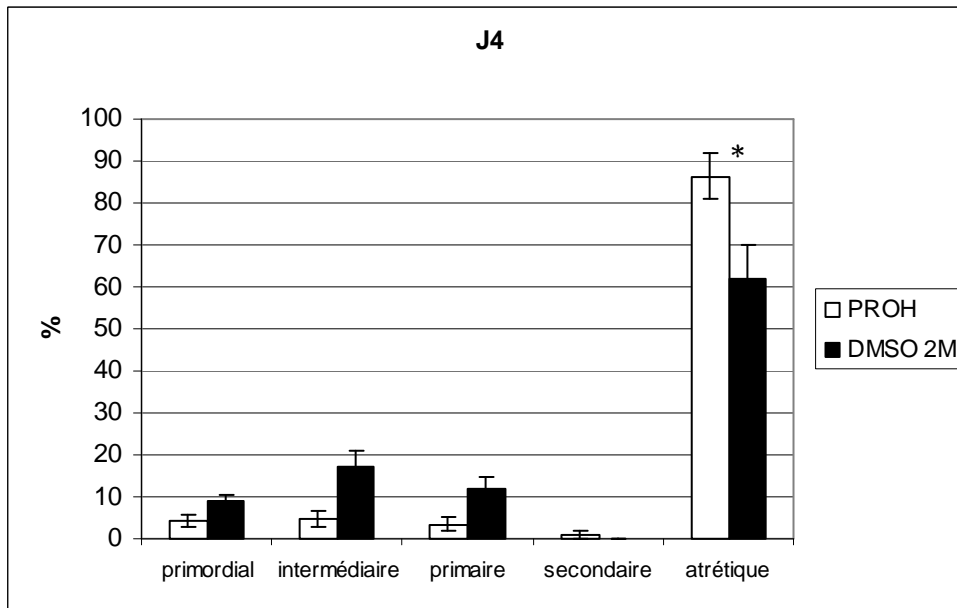


Figure 45 : comparaison des pourcentages moyens à J4 entre la série 7 DMSO2M et la série 8 PROH 1,5M+sucre 0,3M,. *p<0,05.

ETUDES EXPERIMENTALES CHEZ L'HUMAIN

A partir des follicules primordiaux toutes les cultures de tissu ovarien concernant des mammifères de grande taille comme les ruminants et les primates, montrent une initiation de croissance. En culture de tissu frais, des différences sont à noter entre le modèle ovin et le modèle féminin : chez le brebis comme chez le bovin, le babouin et la chèvre (Wandji *et al.* 1996; Wandji *et al.* 1997; Silva *et al.* 2004; Mery *et al.* 2006) la folliculogénèse *in vitro* semble s'arrêter au stade de follicule primaire ; chez la femme la folliculogénèse semble s'arrêter au stade secondaire précoce (Hovatta *et al.* 1997; Wright *et al.* 1999; Louhio *et al.* 2000; Hreinsson *et al.* 2002; Carlsson *et al.* 2006). Hovatta *et al.* ont été les premiers à constater une initiation de croissance des follicules primordiaux jusqu'au stade secondaire au cours d'une culture de 15 à 21 jours (Hovatta *et al.* 1997; Hovatta *et al.* 1999). Cette différence de comportement des tissus ovarien en fonction des espèces nous a conduit à comparer la culture de tissu ovin et féminin. Il nous a semblé intéressant d'étudier en particulier l'expression de GDF9 et BMP15 en culture *in vitro* de cortex ovarien chez la femme, sachant qu'un déficit possible de GDF9 avait été suggéré par Hreinsson *et al.* Ces derniers ont retrouvé un plus grand nombre de follicules au stade secondaire en ajoutant du GDF9 dans le milieu de culture (Hreinsson *et al.* 2002).

Partant de ces observations, se basant sur le modèle de culture chez l'ovine, nous avons donc mis en culture du tissu ovarien humain pendant 8 jours et nous avons étudié par immunohistochimie l'expression de GDF9, BMP15 et leurs récepteurs au recueil (J0) et au 8^e jour de culture. Nous avons mis en culture du tissu ovarien foetal et du tissu adulte.

MATERIELS ET METHODES

I. Origine des ovaires

Au préalable de cette étude, le comité local éthique et les femmes ont donné leur accord pour l'utilisation des produits humains.

A. Ovaires de fœtus

Les ovaires sont issus de fœtus âgés de 22 à 23 semaines d'aménorrhée.

Les ovaires de fœtus ont été récupérés au service d'anatomie pathologique. Les fœtus étaient issus de foeticides, dont l'indication était portée suite au diagnostic échographique de malformations foetales. Seulement 2 fœtus ont été retenus pour la culture du tissu ovarien compte tenu du délai entre le foeticide et le moment du prélèvement qui ne devait pas excéder les 12 heures et de leur état d'autolyse. Le premier fœtus avait comme malformation un syndrome d'Arnold Chiari et le deuxième, un spina bifida étendu.

B. Ovaires adultes

Les ovaires sont issus de patientes âgées de 18, 20 et 32 ans.

Immédiatement après ovariectomie (indications portées dans le cadre de cancer de la sphère gynécologique), les pièces opératoires contenant l'ovaire ont été transmises au laboratoire d'Anatomie Pathologique. Après examen macroscopique par le médecin anatomopathologiste, les prélèvements de cortex en zone saine ont été réalisés et ils ont été

ensuite directement plongés dans le milieu X-Vivo (Bio Whittaker) pour le transfert au laboratoire.

II. Préparation des ovaires

A. Ovaires de Foetus

.Chaque fragment est préparé à température ambiante dans du milieu X-vivo. Compte tenu de la structure histologique (pas de séparation médullaire/cortex) et la taille des ovaires (quelques millimètres), un amincissement rapide et une dissection de l’ovaire ont été effectués permettant de récupérer des fragments d’environ 2 x 2 x 0.5 mm d’épaisseur.

B. Ovaires adultes

La médullaire est retirée à l’aide de ciseaux courbes, les cortex sont découpés en lamelles de 5 x 5mm pour 0.5 mm d’épaisseur.

III. Technique de culture

Le milieu est identique à celui de la brebis en dehors de l’albumine bovine remplacée par l’albumine humaine : le milieu DMEM-Ham’s F-12 (Sigma) enrichi en ITS+1 (Insuline 10 mg.l⁻¹, transferrin 5.5 mg.l⁻¹, selenium 5 µg.l⁻¹, BSA 0.5 mg.l⁻¹, acide linoléique 4.7 µg.l⁻¹) (Sigma), HSA 1.25 mg.l⁻¹ (Sigma), streptomycine 50 µg.l⁻¹ (Sigma), pénicilline-G 75 µg.l⁻¹ (Sigma) est préparé extemporanément et laissé incubé 2 heures dans l’étuve avant utilisation.

La culture est réalisée à 37°C, sous atmosphère saturée en vapeur d’eau (5% O₂, 90 % N₂, 5% CO₂).

Pour chaque jour de culture qui se déroule sur une période de 8 ou 10 jours, 2 lamelles sont posées par puit (2 pour J2, 2 pour J4, 2 pour J8, et 2 pour J10). 2 lamelles sont également

fixées à J0. Pour les ovaires de fœtus 5 points sont effectués, J0, J2, J4, J8 et J10. Pour les ovaires de femme, 3 points sont réalisés, J0, J4 et J8 compte tenu du nombre limité de lamelles à disposition.

La culture s'effectue sur des boîtes à 4 puits (Nunc), sur des filtres de polycarbonate de 0.4 μm (MillicellCM Millipore).

Comme pour la brebis, chaque puit contient 500 μl de milieu et le volume est ajusté pour que les lamelles soient recouvertes d'un film généré par la tension de surface du milieu. 200 μl de milieu sont changés tous les 2 jours.

Les lamelles sont fixées soit dans du liquide de Bouin pour l'examen morphologique soit dans du formol à 4% tamponné pour l'immunohistochimie.

IV. Etude histologique

L'histologie est réalisée au laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital Edouard Herriot (Service du Pr Scoazec).

1. Coupes histologiques

Après inclusion dans la paraffine des coupes semi-sériées de 4 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leitz, germany).

Douze coupes de 4 μm sont réalisées pour chaque hémiovaire et pour chaque temps de culture, ces coupes étant espacées de 60 μm pour éviter de comptabiliser deux fois les mêmes follicules.

2. Coloration

Les coupes sont colorées en HPS : Hématoxyline (Speci), Phloxine B (Réactifs RAL), Safran (Speci).

3. Etude morphologique

L'étude morphologique se base sur la classification de (Gougeon 1986).

- Follicule primordial : ovocyte I de 20 à 30 μm entouré de cellules aplaties (<15 cellules).
- Follicule intermédiaire : ovocyte I entouré de cellules cubiques et de cellules aplaties.
- Follicule primaire : ovocyte I entouré d'une couche complète de cellules folliculaires cubiques.
- Follicule secondaire : ovocyte I entouré par au moins deux couches de cellules cubiques.
- Follicule atrétique : noyau ovocytaire pycnotiques et/ou cytoplasme vacuolé.

4. Etude morphométrique

Les images des follicules et des ovocytes ont été prises à l'aide du logiciel Hamilton Thorne (Hamilton, CA, USA). Les diamètres ont été mesurés à l'aide du logiciel de morphométrie Scion Image (Scion Corporation, Maryland, USA). Pour chaque type folliculaire et ovocytaire, 25 follicules et ovocytes au minimum (ou la totalité des follicules et ovocytes pour ceux en ayant moins) ont été mesurés.

V. Immunomarquage de GDF9, BMP15, BMPRII, BMPRII et TGF β R1

Des coupes de 4 μm pour chaque foetus et femelles ont été réalisées à J0, J4 et J8. Comme pour la brebis, les coupes ont été montées sur des lames Starfrost® (Knittel Glaser), séchées pendant 24 heures à 37°C, déparaffinées dans 3 bains successifs de méthyl cyclohexane (Merck), réhydratées avec une succession de bain décroissant d'éthanol (100%,

95%, 70%, Hexalab) et ensuite placées dans un tampon PBS (Sigma). Le démasquage antigénique a été réalisé par micro-ondes à 95°C dans un tampon de citrate de sodium (Sigma).

Pour le marquage de GDF9 et BMP15, les lames de tissu ont été laissées incubées pendant 2 heures avec l'anticorps primaire de chèvre anti- GDF9 et anti BMP15 humain (Santa Cruz Biotechnology Inc.) à une concentration de $2\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les lames sont laissées incubées pendant 30 min avec l'anticorps secondaire antichèvre biotinylé (Santa Cruz Biotechnology Inc.) et pendant 30 min avec le réactif HRP-streptavidin (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Les lames sont lavées 2 fois à nouveau et sont ensuite coloré avec le complexe diamino-benzidine (Santa Cruz Biotechnology Inc.) pendant 10 min.

Pour le marquage de BMPRII, BMPRII et TGF β RI, nous avons employé le protocole utilisé pour GDF9 et BMP15 avec des anticorps primaires de chèvre (Santa Cruz Biotechnology Inc) anti BMPRII humain, anti BMPRII humain et anti TGF β RI humain à une concentration de $4\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour les 3 récepteurs. La coloration avec le complexe diamino-benzidine (Santa Cruz Biotechnology Inc.) a été réalisée pendant 5 min.

La contre coloration est effectuée avec de l'hématoxyline de Mayer diluée au 1:5 pendant 4 min. Au final, les lames sont montées avec un milieu de montage aqueux « aqueous mounting medium » (DakoCytomation).

L'observation se fait au microscope. Pour le marquage non spécifique, les contrôles suivants ont été réalisés : la première incubation est réalisée avec le tampon de dilution des anticorps sans anticorps primaire ou avec des IgG de chèvre (Santa Cruz Biotechnology Inc.) non immunisée contre les différents facteurs et récepteurs précédents.

RESULTATS

I. Ovaires de Foetus

A. Etude morphologique

Les cortex obtenus à partir du foetus 1 (Tableau 14) et du foetus 2 (Tableau 15) présentent une population folliculaire comparables et ceci pour tous les jours étudiés.

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	85,4%	129	6,0%	9	4,6%	7	0%	0	4,0%	6
J2	50,0%	41	2,4%	2	2,4%	2	0%	0	45,1%	37
J4	52,3%	46	2,3%	2	2,3%	2	0%	0	43,2%	38
J8	53,3%	64	0,8%	1	3,3%	4	0%	0	42,5%	51
J10	52,3%	34	1,5%	1	1,5%	1	0%	0	44,6%	29

Tableau 14 : pourcentage et nombre de follicules de chaque type folliculaire issus du foetus 1 sur 10 jours de culture.

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	77,3%	85	2,7%	3	2,7%	3	0%	0	17,3%	19
J2	49,7%	88	1,7%	3	3,4%	6	0%	0	45,2%	80
J4	47,6%	40	1,2%	1	4,8%	4	0%	0	46,4%	39
J8	54,6%	130	4,2%	10	3,4%	8	0%	0	37,8%	90
J10	43,1%	22	2,0%	1	5,9%	3	0%	0	49,0%	25

Tableau 15 : pourcentage et nombre de follicules de chaque type folliculaire issus du foetus 2 sur 10 jours de culture.

Jours de culture	Primordiaux %	Intermédiaires %	Primaires %	Secondaires %	Atrétiques %
J0	81,3%	4,3%	3,7%	0,00%	10,6%
J2	49,9%	2,1%	2,9%	0,00%	45,2%
J4	49,9%	1,7%	3,5%	0,00%	44,8%
J8	54,0%	2,5%	3,3%	0,00%	40,2%
J10	47,7%	1,7%	3,7%	0,00%	46,8%

Tableau 16 : pourcentage moyen de chaque type folliculaire issu des 2 foetus sur 10 jours de culture.

Pour les 2 foetus, nous observons une atrésie folliculaire importante passant de 10,6% de follicules atrétiques à J0 à 45,2% dès le 2^e jour de culture, ce chiffre restant stable jusqu'à J10, avec 46,8% de follicules atrétiques. A partir du 2^e jour de culture, les taux des différentes populations sont stables au cours de la culture : 49,9% de follicules primordiaux à J2 et 47,7% à J10. Pour les follicules intermédiaires et primaires, 2,1% et 2,9% à J0 à 1,7% et 3,7% à J10 respectivement. Aucun follicule secondaire n'a été observé à J0 et pendant les jours de culture (Tableau 16, Figure 46 et Figure 47).

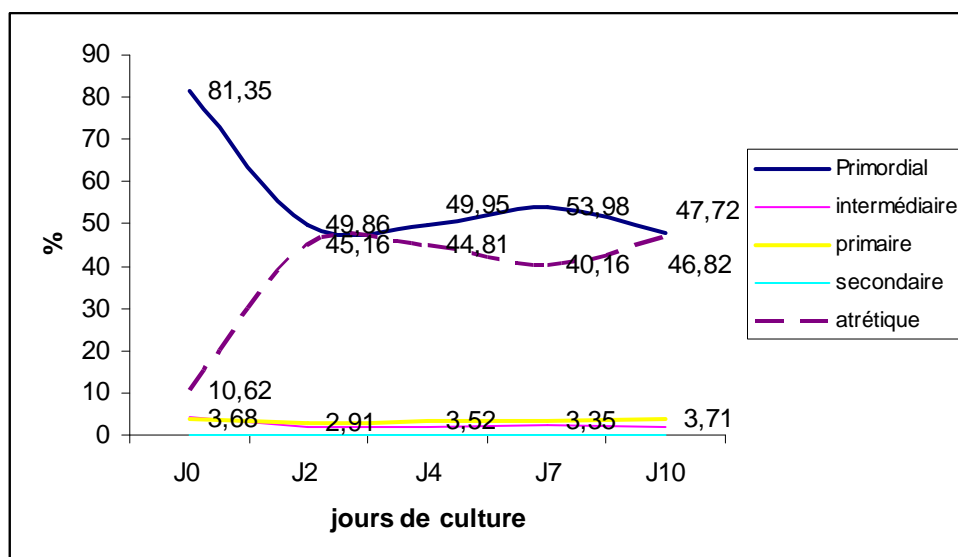


Figure 46 : 2 foetus, tissu frais, distribution des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrétiques sur 10 jours de culture.

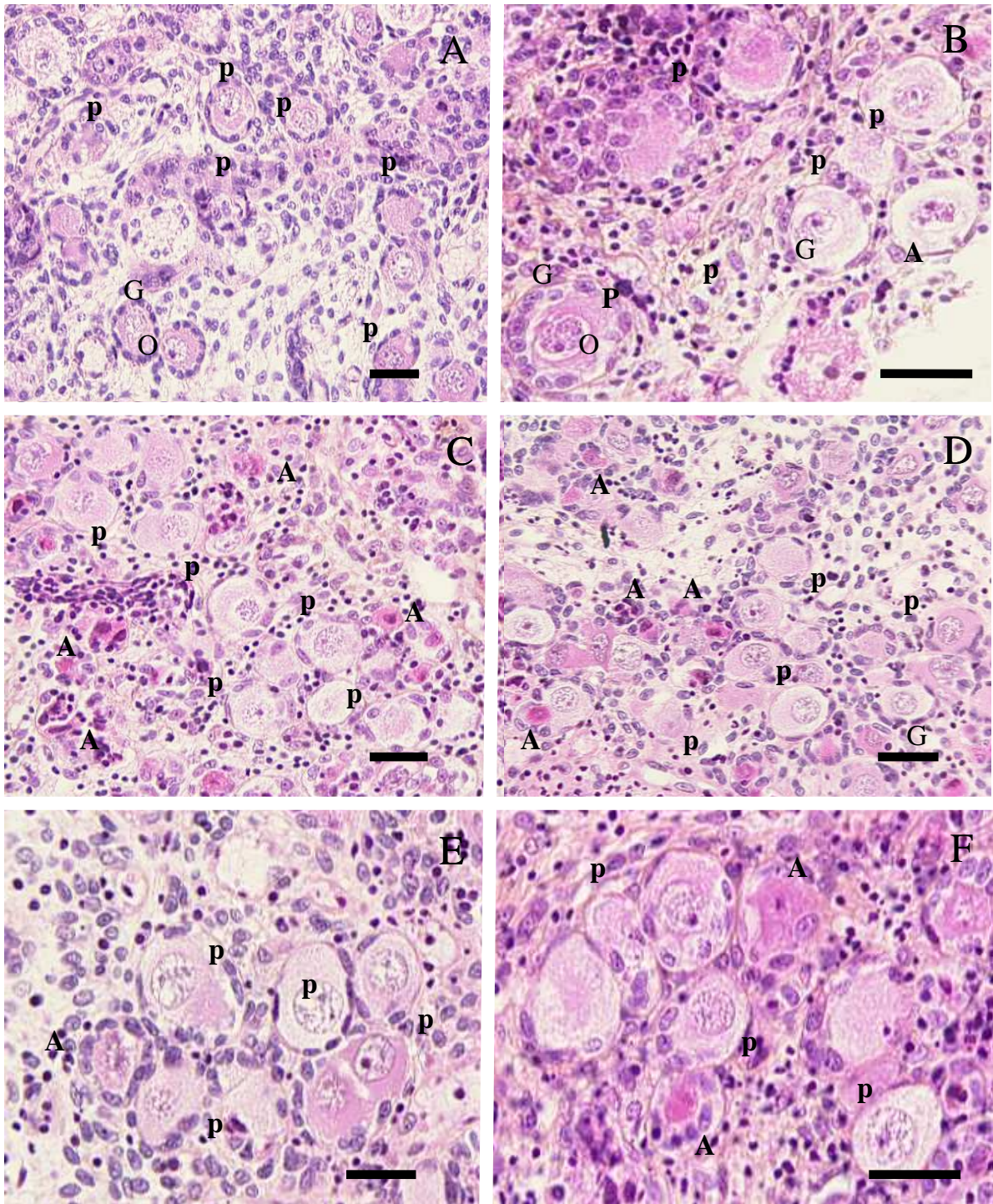


Figure 47 : aspect morphologique de follicules ovariens (coloration HPS). Follicule primordial à J0 (A), follicules primaires, primordiaux et atrétiques à J8 (B, C, D), J0 (E) et J8 (F), noyau. p, follicule primordial, P, follicule primaire, A, follicule atrétique ; O ovocytes, GC, granulosa cellules, barre d'échelle = 20 μ m.

B. Immunolocalisation de GDF9 et BMP15 et leurs récepteurs

Pour GDF9, un marquage est observé dans le cytoplasme de l'ovocyte et des cellules folliculeuses à J0 pour tout type folliculaire, à J4 et J8 nous observons le même type de marquage (Figure 47).

Pour BMP15, un marquage dans le cytoplasme de l'ovocyte et des cellules folliculeuses est observé pour tout les types folliculaires à J0, J4 et J8 (Figure 47).

Pour les 3 récepteurs, le marquage est également observé dans le cytoplasme de l'ovocyte et des cellules folliculeuses (Figure 48).

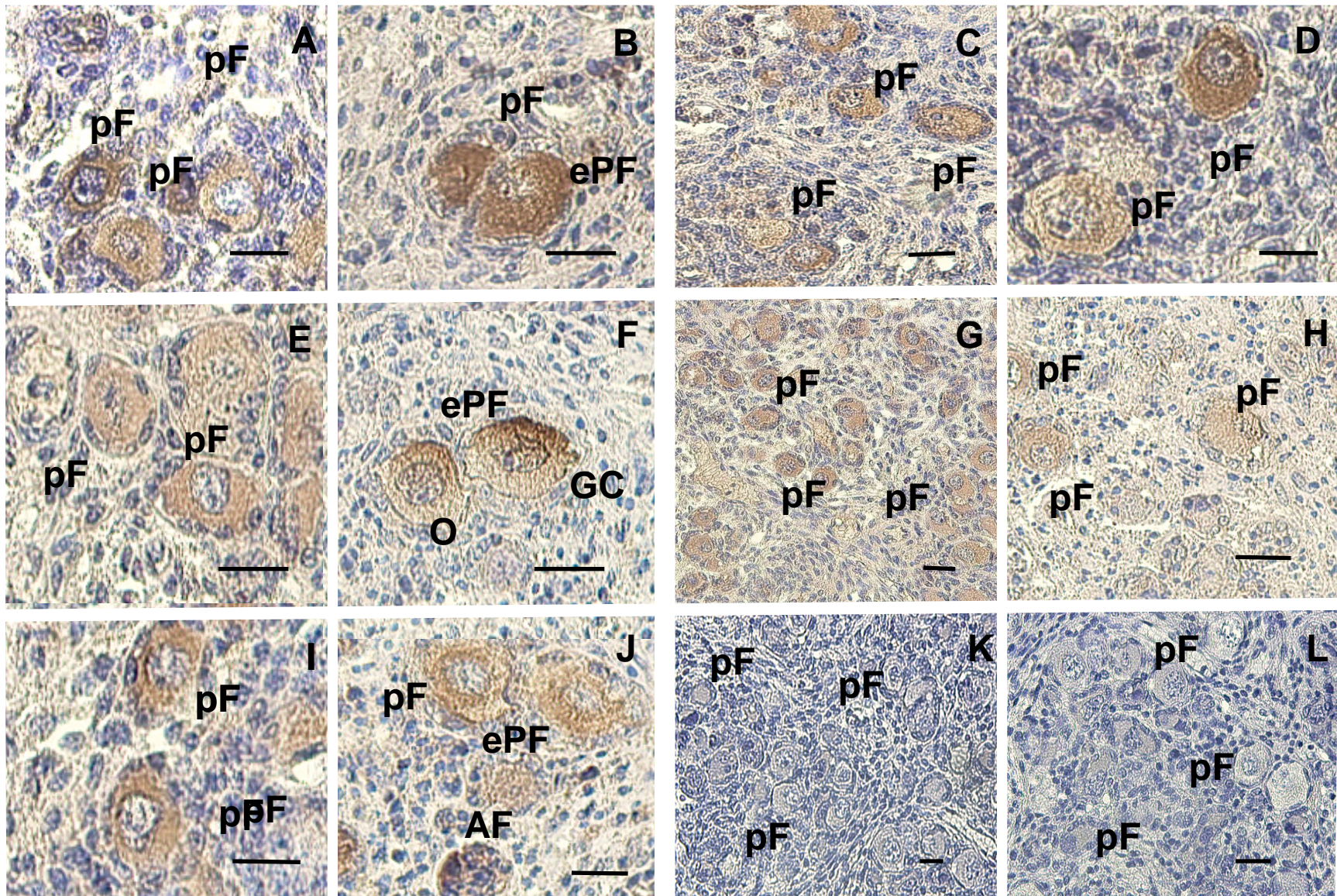


Figure 48 : immunomarquage de BMP15, GDF9, BMPRII, BMPRII et TGFβRI chez le tissu ovarien humain foetal. Immunoréaction positive pour GDF9 à J0 (A), J8 (B). Immunoréaction pour BMP15 à J0 (C) et J8 (D). Immunoréaction positive pour BMPRII à J0 (E) et J8 (F). Immunoréaction positive pour TGFβRI à J0 (I) et J8 (J). Contrôles négatifs diluant de l'anticorps I à J0 (K) ou IgG de chèvre non immunisée (L). PF, follicule primaire, ePF, follicule intermédiaire, pF, follicule primordial, O, ovocyte, GC, cellules de la granulosa, barre d'échelle 20 μm.

II. Ovaires adultes

A. Etude morphologique

Pendant la culture, le pourcentage moyen de follicules atrétiques a augmenté pendant la culture passant de 9,6% à J0 vs 18,4 à J4 et 21,9% à J8 p=NS, le taux des follicules primordiaux a chuté : 67,7% (J0) vs 36,8% (J8) p<0,05; le taux de follicules primaires a augmenté : 7,9% (J0) vs 14,8% à J4, jusqu'à 15,1% au 8e jour p=NS. Le pourcentage moyen des follicules intermédiaires a augmenté : 14,7% à J0 vs 23,3% à J8, p=NS. Quelques follicules secondaires ont été retrouvés : 0,14% à J0, 0,18%, à J4 jusqu'à 2,87%, à J8, p=NS (Tableau 17 et Figure 49).

La Figure 50 montre l'aspect morphologique des follicules pendant la culture.

Jours de culture	Primordiaux		Intermédiaires		Primaires		Secondaires		Atrétiques	
	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
J0	67,7%(±5,3)	293	14,7%(±1,1)	55	7,9%(±0,31)	31	0,1%(±0,1)	1	9,5%(±4,1)	23
J4	50,8%(±2,4)	406	15,8%(±1,7)	121	14,8%(±1,7)	114	0,1%(±0,1)	2	18,4%(±2,3)	125
J8	36,8%(±3,9)	99	23,3%(±4,3)	75	15,1%(±2,1)	41	2,8%(±1,5)	5	21,9%(±2,1)	61

Tableau 17 : pourcentage moyen (sem entre parenthèse) et nombre de follicules (N) de chaque type folliculaire issus des 3 femmes sur 8 jours de culture.

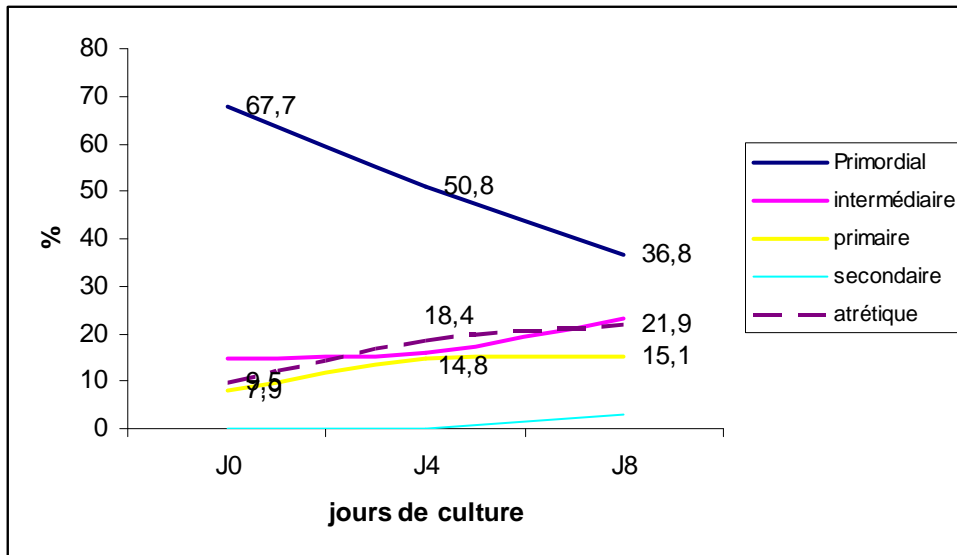


Figure 49 : ovaires adultes, distributions des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, secondaires et atrétiques sur 8 jours de culture.

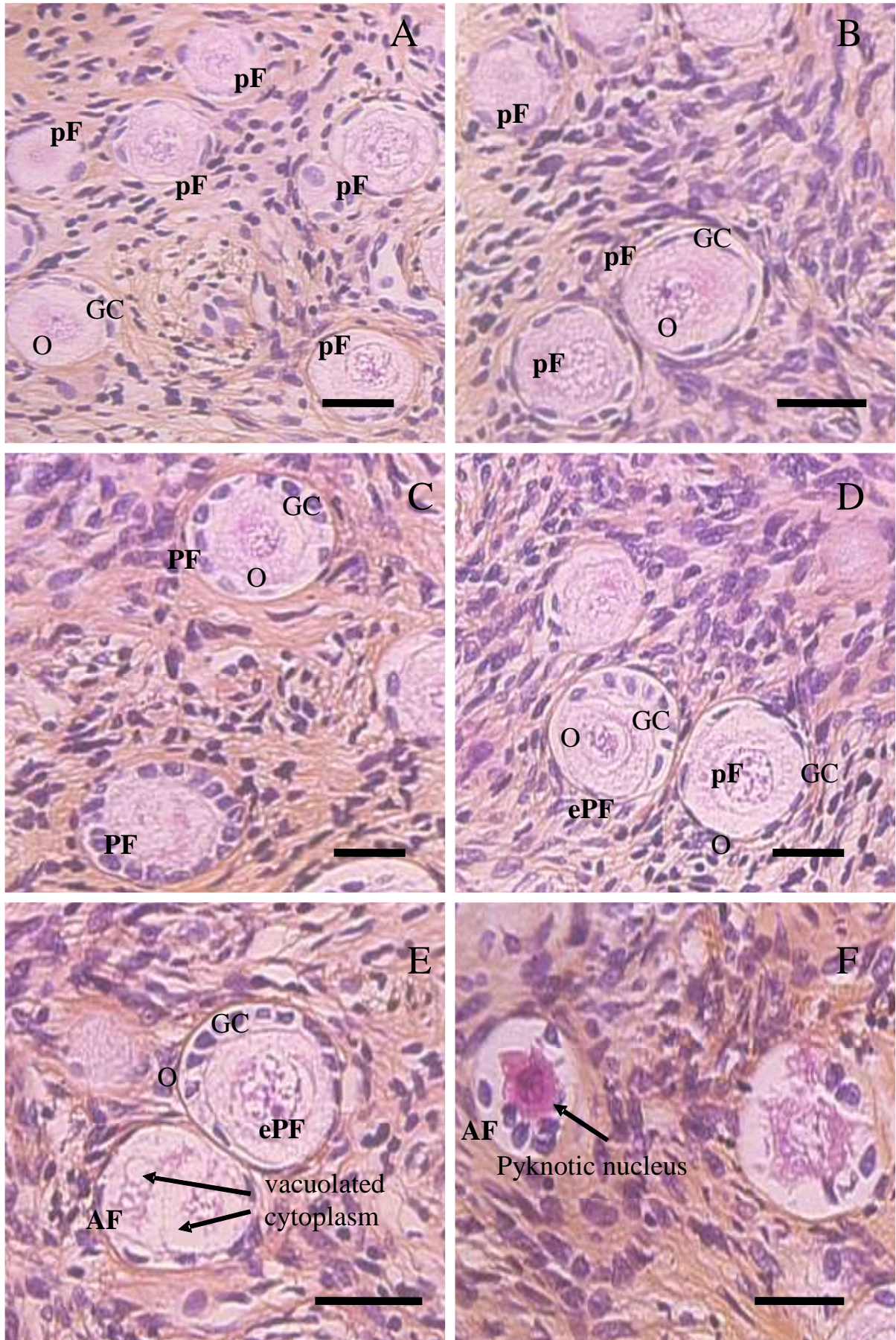


Figure 50 : aspect morphologique de follicules ovariens (coloration HPS). Follicules primordiaux à J0 (A et B), follicule primaire à J8 (C), follicule intermédiaire à J8 (D), follicule intermédiaire et atréitique avec vacuoles cytoplasmiques (E), follicule secondaire (D), follicule atréitique avec un noyau pycnotique (E) et vacuoles cytoplasmiques (F). pF, follicule primordial, ePF, follicule intermédiaire, PF follicule primaire, AF follicule atréitique ; O ovocytes, GC, granulosa cellules, barre d'échelle = 20 μ m. 142

B. Immunolocalisation de GDF9 et BMP15 et leurs récepteurs

Les lames des cortex ovariens contiennent des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires et de rares secondaires. A J0, tous les types folliculaires ont montré un marquage pour GDF9 dans le cytoplasme de l'ovocyte et des cellules folliculeuses (Figure 51). Le marquage pour BMP15 est identique à celui de GDF9. À J8 la distribution folliculaire est différente de J0, mais l'immunomarquage observé pour GDF9 et BMP15 est identique à celui de J0 et ceci pour tous les types folliculaires (Figure 51, A, B, C, D). Aucun marquage n'est observé pour les témoins négatifs (Figure 51, K, L).

A J0, tous les types folliculaires ont montré un immunomarquage pour BMPRII, BMPRII et TGF β RI dans le cytoplasme de l'ovocyte et celui des cellules folliculeuses. Pour J8, un immunomarquage pour BMPRII, BMPRII et TGF β RI identique à celui de J0 a été retrouvé (Figure 51, E, F, G, H, I, J). Les témoins négatifs n'ont pas révélé de marquage (Figure 51, K, L).

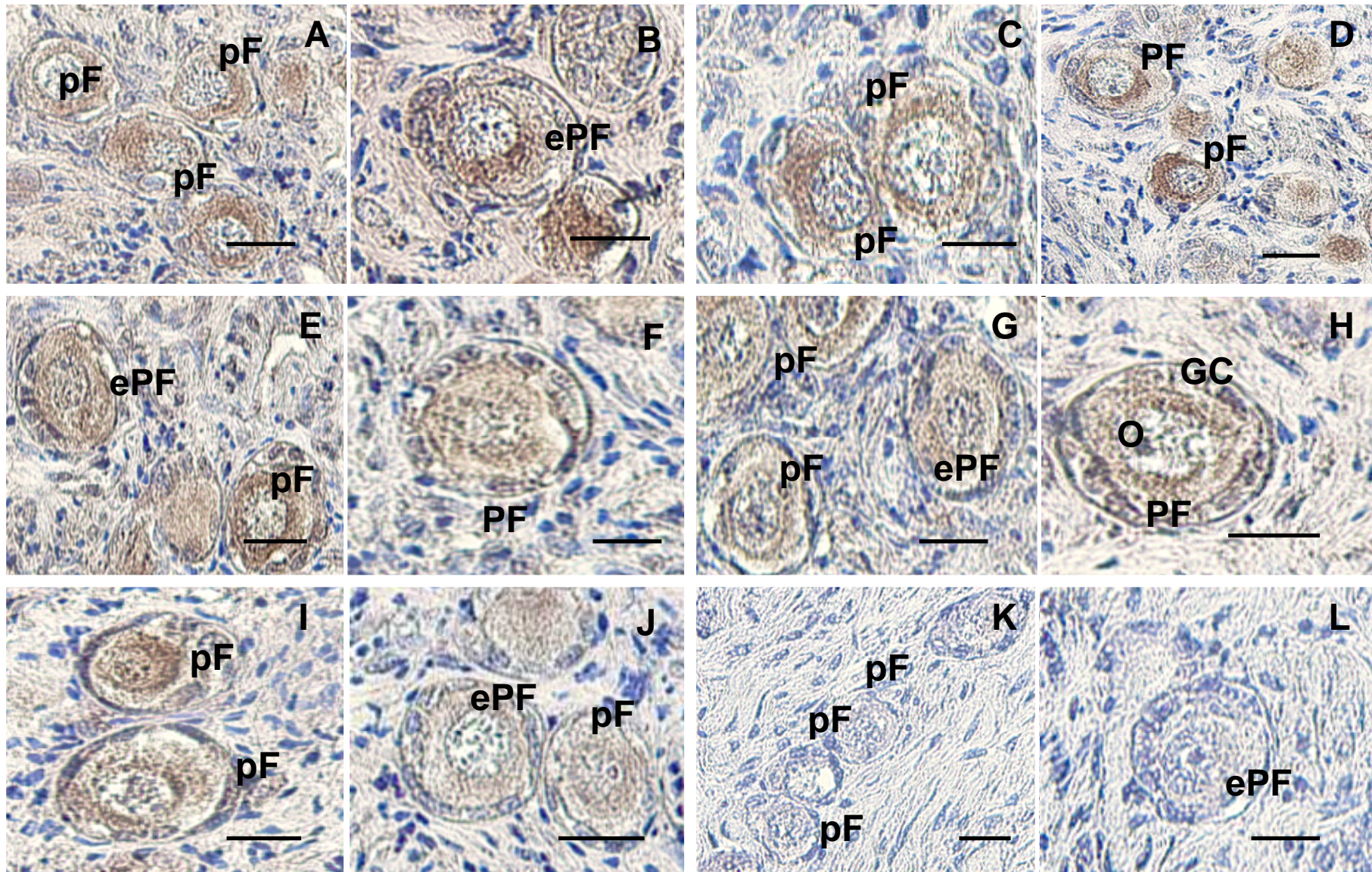


Figure 51 immunomarquage de BMP15, GDF9, BMPRI, BMPRII et TGFβRI chez le tissu ovarien humain adulte. Immunoréaction positive pour GDF9 à J0 (A), J8 (B). Immunoréaction pour BMP15 à J0 (C) et J8 (D). Immunoréaction positive pour BMPRI à J0 (E) et J8 (F). Immunoréaction positive pour TGFβRI à J0 (I) et J8 (J). Contrôles négatifs, diluant de l'anticorp laire à J0 (K) ou IgG de chèvre non immunisée (L). PF, follicule primaire, ePF, follicule intermédiaire, pF, follicule primordial, O, ovocyte, GC, cellules de la granulosa, barre d'échelle =20 μm.

C. Étude morphométrique

jours	primordiaux	intermédiaires	primaires
J0	29,6	39,6	40,0
J2	31,6	40,0	44,0
J4	30,8	36,0	42,0
J6	30,4	38,0	42,8
J8	27,6	40,0	44,0

Tableau 18 : diamètre moyen pour chaque type folliculaire des fœtus 1 et 2 à chaque jour de culture

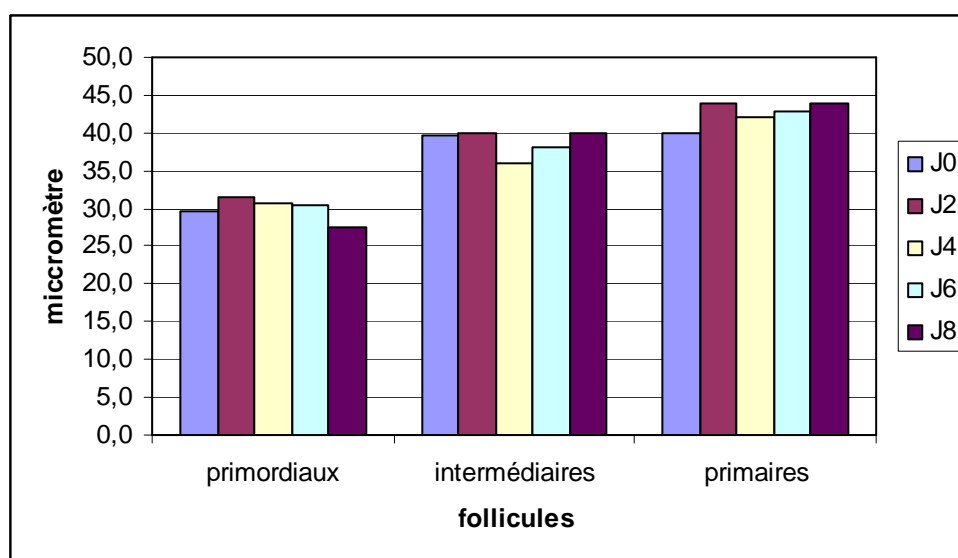


Figure 52 : évolution des diamètres folliculaires des fœtus 1 et 2 au cours de la culture

jours	primordiaux	intermédiaires	primaires
J0	24,0	32,0	32,4
J2	26,8	34,0	34,0
J4	26,4	32,0	34,0
J6	27,2	34,0	34,8
J8	25,2	34,0	36,0

Tableau 19 : diamètre moyen pour chaque type ovocytaire des fœtus 1 et 2 à chaque jour de culture

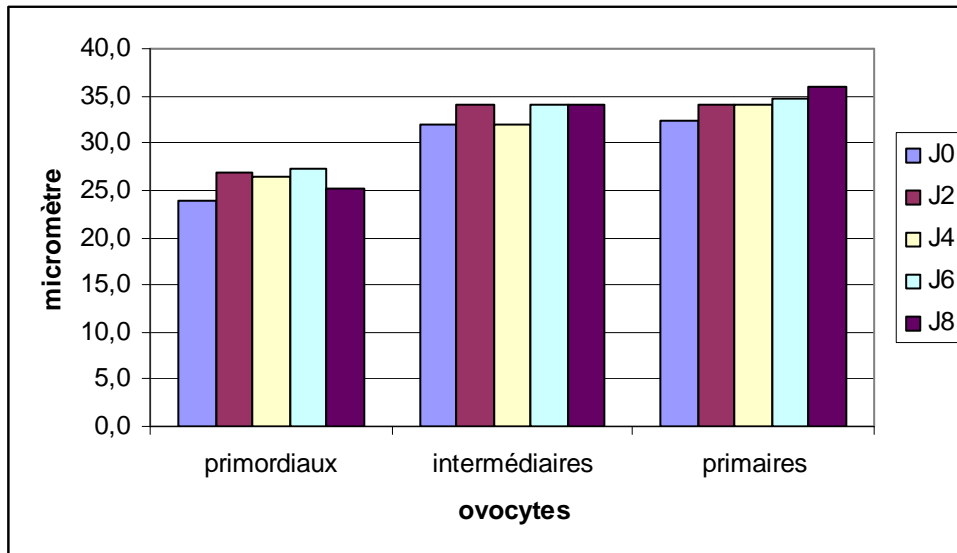


Figure 53 : évolution des diamètres ovocytaires des fœtus 1 et 2 au cours de la culture

jours	primordiaux	intermédiaires	primaires
J0	38,6	40,4	50,0
J4	38,4	44,8	53,6
J8	41,2	44,0	53,6

Tableau 20 : diamètre moyen pour chaque type folliculaire des femmes à chaque jour de culture

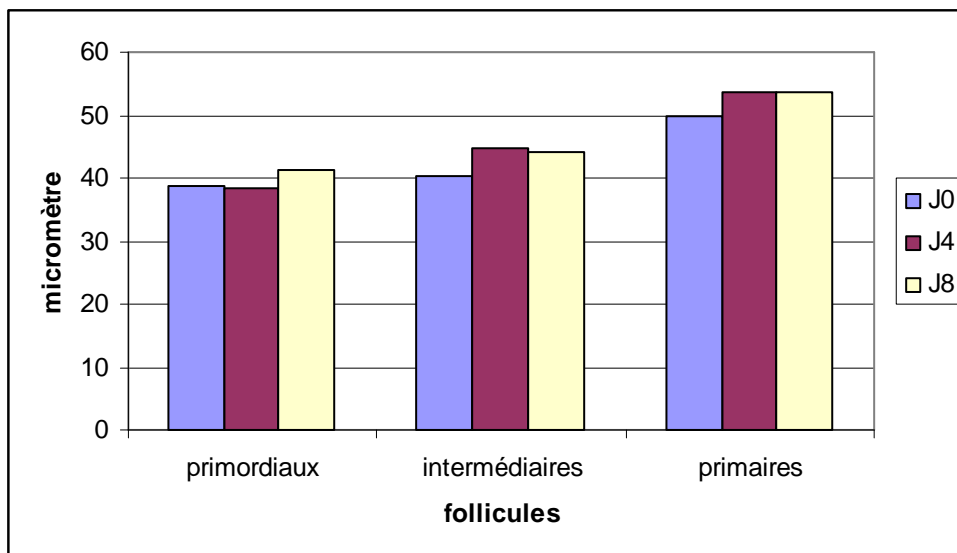


Figure 54 : évolution des diamètres folliculaires des femmes au cours de la culture

jours	primordiaux	intermédiaires	primaires
J0	31,8	38,6	37,2
J4	32,0	38,4	38,8
J8	36,6	38,0	40,0

Tableau 21 : diamètre moyen pour chaque type ovocytaire des femmes à chaque jour de culture

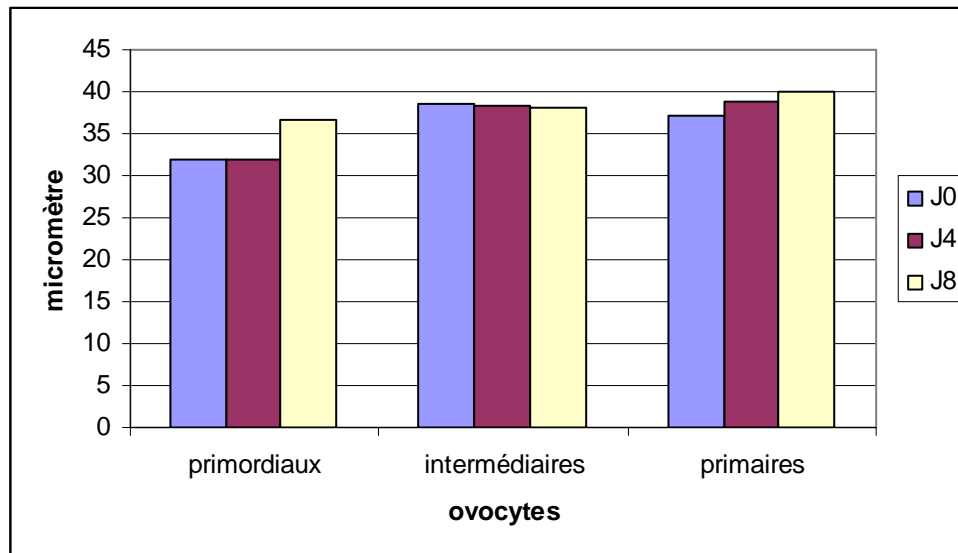


Figure 55 : évolution des diamètres ovocytaires des femmes au cours de la culture

Dans notre étude, selon les mêmes conditions de culture, aucune initiation nette de croissance n'est observée pour le tissu ovarien humain adulte mais celle ci semble se dessiner. Pour le tissu d'origine fœtal aucune entrée en croissance n'est constatée. Les diamètres des follicules et ovocytes primordiaux, intermédiaires et primaires sont significativement différents entre eux mais les modifications de leur diamètre respectif au cour de la culture ne montrent pas d'évolution nette. Les diamètres mesurés pour les follicules et ovocytes des fœtus sont comparables à ceux observés par Sadeu et al en 2006 :

À J0, les follicules primordiaux 29,6 vs 29,6 μm , intermédiaires 39,6 vs 31.8 μm , primaires 40,0 vs 36.2 μm ; à J8 follicules primordiaux 27,6 vs 32.4 μm , intermédiaires 40,0 vs 35.2 μm et primaires 44,0 vs 48 μm (pour Sadeu et al J8 correspond à l'intervalle 7-14 jours).

A J0, Pour les ovocytes « primordiaux » 24,0 vs 25.0 μm , intermédiaires 32,0 vs 25.7 μm et primaires 32,4 vs 27.8 μm ; à J8 ovocytes « primordiaux », 25,2 vs 27,6 μm , intermédiaires 34,0 vs 29,2 μm et primaires 36,0 vs 38,4 μm .

Les diamètres sont également comparables à ceux de l'étude chez l'adulte (Sadeu et Smitz 2008). Dans cette étude les follicules intermédiaires et primordiaux sont regroupés en « resting follicles ».

A J0, pour les follicules primordiaux 38,6 vs 39,7 μm (resting follicles) et primaires 50.0 vs 48,9 μm . A J8 follicules primordiaux 41,2 vs 41,7 μm et primaires 53,6 vs 50,3 μm .

A J0, pour les ovocytes « primordiaux » 31,8 vs 35,3 μm et primaires 37,2 vs 37,8 μm .
A J8 ovocytes « primordiaux » 36,6 vs 34,1 μm et primaires 40,0 vs 37,2 μm .

DISCUSSION

Discussion des résultats chez la brebis :

Dans le cadre de la cryoconservation du tissu ovarien, et plus particulièrement son utilisation en culture in vitro après décongélation, nous avons constaté deux problèmes liés à la culture, la survie et le blocage de croissance. Au cours de notre étude nous avons exploré ces deux problématiques à l'aide de deux modèles, le modèle ovin et humain.

Blocage de croissance en culture de tissu frais chez l'ovine :

Nos protocoles de culture se sont basés sur les protocoles utilisés par différentes équipes comme l'utilisation du milieu MEM (Cortvrindt et al. 1996; Hovatta et al. 1997) supplémenté avec 5 à 10% de sérum (Hovatta et al. 1997) auquel ont été ajoutés de l'insuline, du sélénium et de la transferrine dans l'ITS (Eppig and O'Brien 1996). La préparation des fragments ovariens s'est basée sur les précédents travaux de Demirici (2002) dans notre équipe. Le cortex ovarien est composé essentiellement de follicules primordiaux et c'est leur capacité de développement jusqu'au stade préovulatoire qui déterminera la réussite de cette technique.

Chez l'ovine, nous n'avons pas exploité l'analyse morphométrique, ce travail avait déjà été réalisé par Demirici en 2002 sans montrer de différence significative entre les différents types folliculaire et ovocytaire au cours de la culture (Demirici 2002). Au cours de nos résultats préliminaires, les diamètres des follicules primordiaux, intermédiaires, primaires, les diamètres des ovocytes issus des follicules primordiaux, intermédiaires et primaires ont montré des résultats comparables. Au cours des 15 jours de culture l'analyse morphologique a montré une survie correcte des follicules ovariens avec 14,5% follicules atreétiques à J0 et 27,1% à J15

($p < 0.05$). En parallèle on observe une baisse significative de la proportion de follicules primordiaux, de 58,6% (J0) à 21,2% (J15) ($p < 0,01$), une augmentation significative des primaires, de 3,2% (J0) à 31,5% dès J4 ($p < 0,01$), ce taux restant stable jusqu'à J15 (36,5%). Nous avons donc observé une initiation de croissance dès les premiers jours de culture. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment chez le bovin (Wandji et al. 1996), le babouin (Wandji et al. 1997) et chez l'humain (Hovatta *et al.* 1997; Hovatta *et al.* 1999; Wright *et al.* 1999; Louhio *et al.* 2000; Hreinsson *et al.* 2002; Scott *et al.* 2004; Carlsson *et al.* 2006; Telfer *et al.* 2008).

Les mécanismes qui entrent en jeu dans l'initiation de la croissance folliculaire sont encore méconnus. Dans l'ovaire, la présence de facteurs inhibiteurs qui bloquent l'initiation de la croissance a été suggéré par Peters et al (Peters et al. 1973). Plusieurs molécules ont montré un effet potentiel: la somatostatine (SST) (Goddard et al. 2001), l'AMH (Durlinger *et al.* 1999; Carlsson *et al.* 2006) la protéine de retinoblastome (pRb) (Picton 2001), la protéine du gène suppresseur de la tumeur de Wilms (WT1) (Hsu et al. 1995). Dans notre système de culture, ces inhibiteurs d'initiation de croissance seraient absents ou en concentration insuffisante. Ceci pourrait résulter du retrait de la médullaire, hypothèse envisagée par Wandji et al. (Wandji *et al.* 1996; Wandji *et al.* 1997). Une autre hypothèse suggère que le milieu de culture serait pourvu des facteurs nécessaires pour l'activation de la croissance tels que Epidermal Growth Factor (EGF) (Picton 2001; Silva *et al.* 2004), BMP7 (Lee et al. 2001), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Ben-Haroush et al. 2005), Leukemia Inhibiting Factor (LIF) (Nilsson et al. 2002), Bone Morphogenic Protein (BMP) 4 (Nilsson and Skinner 2003).

Quel que soit son mécanisme, par levée d'inhibition ou par l'action de facteurs stimulateurs, l'entrée en croissance se ferait par l'intermédiaire du couple c kit/kit ligand. Ce couple a une action anti apoptotique (Carlsson *et al.* 2006; Moniruzzaman and Miyano 2007)

mais est également impliqué dans l'initiation de croissance (Hutt et al. 2006). Le kit ligand (Stem Cell Factor SCF) sécrété par les cellules de la granulosa, agirait sur l'ovocyte via son récepteur (c-kit) présent sur la membrane ovocytaire. La sécrétion de kit-ligand en réponse à une augmentation intracellulaire AMPc (Packer et al. 1994) serait sous la dépendance des facteurs inhibiteurs ou stimulateurs décrits préalablement.

Nos conditions de culture sont favorables à l'entrée en croissance folliculaire mais s'avèrent insuffisantes pour le passage aux follicules secondaires et préantraux : de rares follicules secondaires ont été observés, aucun à J7 et J15, et représentent seulement 0,5%, 1,1%, 1,0%, et 2,1% de l'ensemble des follicules pour J0, J2, J4 et J10 respectivement. Compte tenu des délais de plusieurs mois pour le développement folliculaire *in vivo*, il est envisageable que pour voir apparaître des follicules secondaires en culture, des délais de plusieurs semaines soient nécessaires. Nos délais de culture étant trop courts, seuls des follicules primaires sont présents. Cependant, *in vitro* le développement semble accéléré, le processus d'initiation qui *in vivo* prend plusieurs semaines ne prend que quelques jours en culture. Pour Telfer et al, à partir des follicules primordiaux, son système de culture en deux étapes permet l'apparition de cavité de type antral dans les follicules ovariens humains en 10 jours (culture de 6 jours des follicules primordiaux en tissu puis culture de 4 jours de follicules secondaires isolés, extraits du tissu) (Telfer *et al.* 2008). Dans de précédents travaux de notre équipe (Demirci 2002), les cultures de tissu de 30 jours ont montré peu de follicules secondaires au 30^e jours. Toutes ces observations évoquent plutôt un blocage de croissance.

Les mécanismes qui régissent le passage du follicule primaire au follicule secondaire sont différents de ceux qui commandent l'initiation. La plupart des études font apparaître GDF9 et BMP15 comme des facteurs indispensables pour les premières étapes de folliculogénèse, en particulier pour le passage du follicule primaire au follicule secondaire.

Chez des souris déficientes (Knock Out) en GDF9, une stérilité et un blocage de la croissance folliculaire au stade primaire sont observés (Dong et al. 1996). Chez des souris déficientes (Knock out) en BMP15, malgré un taux d'ovulation et de fécondation altérés les souris restent fertiles et la croissance folliculaire semble normale en apparence (Yan et al. 2001). Chez la brebis, une stérilité est reportée pour des brebis mutantes homozygotes que ce soit pour le gène GDF9 ou le gène BMP15, (Galloway et al. 2000; Hanrahan et al. 2004). Chez des brebis immunisées contre GDF9 et/ou BMP15, la croissance folliculaire est bloquée au stade primaire (Juengel et al. 2004). Chez la femme, une insuffisance ovarienne a été décrite associée à une mutation sur le gène BMP15 (Di Pasquale et al. 2004) et sur le gène GDF9 (Kovanci et al. 2007). Hreinsson et al en 2002 ont observé une augmentation du taux de follicules secondaires en culture in vitro chez la femme après supplémentation du milieu en GDF9 (Hreinsson et al. 2002).

L'ovaire semble être la source principale de GDF9 et BMP15, même si pour certaines espèces, ils sont retrouvés dans d'autres tissus comme l'hypophyse et le testis (Fitzpatrick *et al.* 1998; Aaltonen *et al.* 1999). Ces deux protéines appartiennent à la superfamille des Transforming Growth Factors β . Les TGF β sont synthétisées sous forme de prépropeptides avec une « région active » de la protéine localisée dans la partie terminal COOH (Shimasaki et al. 2004). Classiquement les membres de la TGF β superfamily sont actifs sous forme d'homo ou d'hétérodimères liés par une double liaison covalente disulfide issue de résidus cystéine. BMP15 et GDF9 ne possèdent pas ces résidus cystéine mais peuvent former par des liaisons non covalentes des complexes d'homo et d'hétérodimères. (Liao et al. 2003; Moore et al. 2003; Shimasaki et al. 2004). Les membres de la TGF β superfamily agissent via des complexes de récepteurs issus de 3 types de récepteurs membranaires à activité sérine thréonine kinase : sept récepteurs de type I, activin receptor-like kinase ALK 1-7, cinq

récepteurs de types II (ActRIIa, ActRIIb, BMPRII, TGF β RII et AMRHII) et un récepteur de type III, le TGF β RIII (Shimasaki et al. 2004). Après activation, ces récepteurs vont entraîner la phosphorylation de molécules qui transmettent les signaux intracellulaires, les Smad (Roelen et al. 2003).

Dans nos études, avant la mise en culture (J0), un immunomarquage positif pour GDF9 et BMP15, témoignant de la présence de leur protéine a été retrouvé dans le cytoplasme des ovocytes comme cela avaient déjà été décrit chez la femme (Aaltonen et al. 1999; Teixeira Filho et al. 2002), le marsupial (Eckery et al. 2002), les rongeurs, (Laitinen *et al.* 1998; Jaatinen *et al.* 1999) et les ruminants (Bodensteiner et al. 1999; Bodensteiner et al. 2000; Galloway et al. 2000). Nous avons également observé leur expression dans les cellules folliculeuses comme cela avait été observé chez la chèvre (Silva et al. 2005) et le primate (Duffy 2003).

Chez le rat et la souris et l'humain, GDF9 n'est exprimé qu'à partir du stade de follicule primaire (Fitzpatrick *et al.* 1998; Laitinen *et al.* 1998; Aaltonen *et al.* 1999; Jaatinen *et al.* 1999). Nous avons observé la présence de GDF9 dès le stade de follicule primordial comme ceci avait été observé chez le hamster, le bovin, le marsupial, le primate et pour certains auteurs chez l'humain (Bodensteiner *et al.* 1999; Gougeon and Busso 2000; Eckery *et al.* 2002; Teixeira Filho *et al.* 2002; Wang and Roy 2004; Mery *et al.* 2006). Nous avons également observé la présence de BMP15 pour l'ovin dès le stade de follicules primordial comme chez la chèvre (Silva et al. 2005), le brushtail possum (Eckery et al. 2002). Dans des études antérieures, chez le rat, la souris, la brebis et l'humain, BMP15 n'était exprimé qu'à partir du stade de follicule primaire (Laitinen *et al.* 1998; Aaltonen *et al.* 1999; Jaatinen *et al.* 1999; Galloway *et al.* 2000; Teixeira Filho *et al.* 2002). Ces différences retrouvées entre les espèces peuvent être liées à une variabilité interspécifique ou à des différences de méthodologie (différence de sensibilité et de spécificité des tests) ce qui explique que chez la

même espèce des résultats contradictoires sont rapportés. Pour notre étude, avant la mise en culture, nous avons retrouvé la présence des protéines de GDF9 et BMP15 dès le stade des follicules primordiaux en utilisant une technique d'immunohistochimie, alors que Galloway *et al* pour la brebis et Teixeira Filho *et al* pour la femme ont détecté l'ARNm de BMP15 à partir du stade du follicule primaire par hybridation in situ (Galloway et al. 2000; Teixeira Filho et al. 2002).

Dans notre étude, malgré l'initiation de la croissance folliculaire, nous observons un arrêt de croissance précoce avec de rares follicules secondaires. L'hypothèse de notre étude suggérant que cet arrêt au stade de follicule primaire pouvait résulter d'une absence totale de sécrétion de GDF9 et BMP15 ne s'est pas confirmée puisque nous avons retrouvé les ARNm et les protéines de BMP15 et de GDF9 tout au long de notre culture à J7 et J15. Récemment, l'équipe de Sadeu et al. a retrouvé des résultats similaires avec une analyse quantitative de l'ARNm de GDF9 et BMP15 issu de tissu ovarien chez le modèle murin en culture qui a montré un niveau d'expression comparable entre le tissu néonatal placé en culture 13 jours et le tissu ovarien de souris du même âge (Sadeu *et al.* 2008).

Ces résultats ne permettent cependant pas d'écarter complètement la responsabilité de ces protéines dans l'arrêt de croissance observée. Notre étude ne renseigne pas sur l'intégrité fonctionnelle des protéines, et ne permet pas de savoir si la concentration de ces protéines dans notre milieu est suffisante. Par ailleurs, il est possible qu'il y ait dans notre milieu de culture, la présence d'un facteur inhibiteur de GDF9 et BMP15 comme la follistatine (Otsuka et al. 2001). BMP15 et GDF9 peuvent jouer un rôle indirect dans le blocage de croissance observée. Un déficit d'expression de leurs récepteurs aurait pu être une explication : BMPRII et ALK5 (TGF β RI) ont été décrit comme des récepteurs de GDF9 (Vitt et al. 2002), (Mazerbourg et al. 2004) et BMPRII et ALK6 (BMPRIIB) comme des récepteurs pour BMP15

(Moore et al. 2003). Dans notre culture les expressions de BMPRII et BMPRIIB ont été décelées. Ces récepteurs vont engendrer une cascade de phosphorylations intracellulaire pour modifier l'expression génique, par la voie des Smad. GDF9 est capable d'activer la voie des Smad 2 et 3 (Kaivo-Oja et al. 2003; Roh et al. 2003) alors que BMP15 active les voies des Smad 1, 5 et 8 (Moore et al. 2003). Chaque acteur de cette cascade peut avoir un rôle dans le blocage de croissance. D'autres voies encore méconnues peuvent avoir un lien avec le blocage de croissance folliculaire observé.

Amélioration de la survie tissulaire après congélation/décongélation :

Partant des travaux de notre équipe (Demirci 2002), notre protocole de congélation de référence est celui décrit préalablement utilisant du DMSO 2M et une vitesse de descente en température après seeding de $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. La plupart des équipes utilisent une descente en température après seeding de $0,3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, (figure 22) tiré de la congélation embryonnaire. Notre équipe a augmenté cette vitesse de refroidissement en prenant référence sur la congélation de tissu parathyroïdien (descente en température de $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) (Saxe *et al.* 1990) et en testant plusieurs vitesses (Demirci *et al.* 2002). Le choix du cryoprotecteur DMSO 2M a été utilisé compte tenu des travaux des équipes internationales (Figure 22) et de nos précédents travaux sur la survie tissulaire à la décongélation (Demirci *et al.* 2002). Les premiers essais de culture après congélation/décongélation ont donné des résultats médiocres en terme de survie, le pourcentage de follicules en atresie a augmenté dès J4 (85,7%) (Demirci *et al.* 2002). Nous avons cherché à l'améliorer en explorant diverses hypothèses de travail :

- soit augmenter l'épaisseur de notre tissu de 0,5mm (adapté à la culture) à 1mm, épaisseur qui est apparemment plus adaptée à la congélation/décongélation. Elle apporte comme avantage par rapport à 0,5 mm la possibilité d'utiliser des

protocoles de congélation déjà mis au point pour cette épaisseur et ayant prouvé leur efficacité notamment dans la reprise de l'autogreffe (Salle et al. 2002). Il fallait donc tester cette épaisseur en culture.

- soit modifier nos conditions de culture pour améliorer la survie tissulaire après congélation/décongélation.

Avant de tester ces hypothèses en tissu congelé, nous les avons testé en tissu frais :

Influence de l'épaisseur en culture :

Notre première série de culture, pour des lamelles d'une épaisseur de 1mm jusqu'au 4^e jour, a montré des résultats encourageants. Cependant avec l'avancée de nos travaux sur le tissu frais, nous avons remarqué que la culture des lamelles de 1 mm d'épaisseur montrait une mauvaise survie au 10^e jour de culture, le pourcentage de follicules atrétiques augmente significativement (73,6% à J10 avec 1mm d'épaisseur vs 29,2% pour 0,5 mm d'épaisseur) ($p < 0,05$) et parallèlement les taux de follicules primaires, intermédiaires et primordiaux a diminué significativement dans cette seconde culture (3,3% vs 34,7% $p < 0,05$, 9,6% vs 23,0% $p < 0,05$, 13,4% vs 12,9% $p < 0,05$ respectivement) (Figure 36). Ce problème lié à la survie n'avait pas été observé avec une épaisseur de 0,5 mm puisque les cultures ont pu être prolongées dans nos séries jusqu'à 15 jours (27,1% de follicules atrétiques) (Figure 28 et Tableau 6). De plus même si aucune différence significative n'a pu être mise en évidence, nous notons moins de follicules qui entrent en croissance pour nos cultures de 1mm d'épaisseur à J4 par rapport à l'épaisseur de 0.5mm (13,8 vs 31,5% respectivement, $p = \text{NS}$). Malgré les avantages apportés par l'épaisseur 1mm, celle-ci semble inadaptée à la culture *in vitro* en tissu frais. Elle empêcherait une pénétration efficace du milieu de culture dans la

profondeur du tissu et en augmentant le nombre de cellules entraînerait une consommation excessive du milieu.

Influence des conditions de culture : le support

Nous sommes partis des travaux se basant sur la co-culture embryonnaire pour laquelle 3 types de systèmes différents ont émergé en fonction de la lignée cellulaire utilisée (Lornage *et al.* 1995).

- Les vésicules trophoblastiques (Blakewood *et al.* 1990).
- Les lignées cellulaires appartenant au tractus génital féminin dont les cellules tubaires (Xu *et al.* 1992), les cellules épithéliales utérines (Jayot *et al.* 1995), les fibroblastes utérins (Wiemer *et al.* 1989), les cellules de la granulosa (Plachot *et al.* 1993).
- Les lignées de cellules extra génitales essentiellement les cellules épithéliales de rein d'origine bovine (lignée MDBK) ou simiesque (lignée Véro) (Ouhibi *et al.* 1990). Ces cellules ont été choisies compte tenu de leur origine embryologique, le mésoblaste est identique à celles du tractus génital.

La co-culture en théorie peut augmenter la survie tissulaire par divers mécanismes : élimination des composés cytotoxiques, libération de facteurs cytotrophiques, contacts directs cellules-tissu avec échanges de signaux transmembranaires.

Nous avons choisi les cellules Véro compte tenu de leur origine embryologique et de l'expérience de notre équipe dans la co-culture embryonnaire. Pour éviter tout stress aux cellules Véro utilisées, nous avons employé leur milieu de croissance, « milieu Véro » : Eagle MEM +1% de L-Glutamine 200 mM, 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Néomycine (Sigma), 200 unités. ml^{-1} de Pénicilline, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Streptomycine (Sigma), tampon Hépes à 1 M (Sigma) et 2% de Sérum de Veau Foetal (Cambrex) comme milieu pour la culture des cortex, et ceci pour les deux supports. Ce milieu diffère de notre milieu de culture usuel : DMEM-Ham's F-12

enrichi en ITS+1, BSA 1.25 mg.l⁻¹, streptomycine 50 µg. l⁻¹, pénicilline-G 75 µg. l⁻¹. Les résultats obtenus sur support millicel entre ce milieu « véro » et le milieu usuel sont comparables: 20,0% de follicules atrétiques et 20,4% de primaires à J10 pour le « milieu Véro » sur support millicel vs 22,3% de follicules atrétiques et 32,7% de follicules primaires pour le milieu usuel sur support millicel, p=NS.

Support Véro vs support millicel :

Pour le support Véro, nos résultats ont montré une survie médiocre : dès le 2^e jour, 50,3% de follicules atrétiques jusqu'à 90,4% au 10^e jour versus 13,2% à J2 et 20,0% pour le support millicell. Ces résultats sont différents de ceux retrouvés chez le primate (Yeoman et al. 2005). Des différences sur la méthodologie entre les deux études sont à noter. Chez le primate, l'étude a porté sur la comparaison de la viabilité à la décongélation du tissu à J0 et après 5 jours de co-culture, aucun contrôle de culture sur un autre support n'a été effectué, le test de viabilité n'a pas été réalisé par analyse morphologique mais à l'aide d'un colorant vital (carboxyfluorescein diacetate + succinimidyl ester (100 µg.mL) et iodure de propidium (100 µg.mL; Molecular Probes, Eugene, OR) et les protocoles des monocouches utilisés étaient des monocouches de fibroblastes de souris congelé/décongelées et inactivées par la mitomycine C (vs monocouches de cellules Véro pour notre étude tirées de la co-culture d'embryons). D'autre part, notre étude a porté sur du tissu frais et non sur du tissu congelé/décongelé. Ces différents paramètres entre les deux études peuvent expliquer la différence observée. Compte tenu de ces résultats en tissu frais, nous avons décidé dans un premier temps d'améliorer notre protocole en frais avant de tester le support cellules Véro pour la culture de tissu après congélation/décongélation.

Survie en culture après congélation/décongélation de tissu :

Concernant nos travaux sur le tissu congelé, à J4 le pourcentage moyen de follicules primaires obtenu est plus élevé dans nos cultures avec 1mm d'épaisseur par rapport à l'épaisseur de 0,5mm (11,8% vs 0,4%, $p < 0,01$). Nous observons moins de follicules atrétiques sans être significatif (61,9 % vs 89,8% pour 0,5mm, $p = \text{NS}$) (Figure 41). Une plus faible épaisseur peut modifier l'action des cryoprotecteurs sur le tissu, les résultats pour 0,5 mm peuvent donc être liés aux protocoles de congélation mal adaptés à cette épaisseur : En effet, le cryoprotecteur potentiellement cytotoxique est à une concentration potentiellement trop forte, l'incubation avant congélation sans doute trop longue, ou le protocole d'élimination des cryoprotecteurs après décongélation insuffisant. En terme d'atrésie, les résultats à J4 de notre première culture en DMSO 2M (61,8 % de follicules atrétiques) se rapprochent des quelques résultats publiés chez les grands mammifères (Schmidt *et al.* 2005) mais sont loin de ceux de Sadeu et al. (17,8% d'atrésie à J0 contre 19,8% à J63) (Schmidt *et al.* 2005; Sadeu *et al.* 2006).

Compte tenu de l'effet cytotoxique du DMSO, l'utilisation de ce cryoprotecteur pourrait avoir une influence sur le développement des follicules *in vitro*. Demirci (Demirci 2002) a montré une efficacité quasi similaire du PROH 1,5M+sucrose 0,3M et PROH 2M + sucrose 0,3M comparé au DMSO 2M au niveau de l'étude morphologique post cryoconservation. Etant donné les caractéristiques cytotoxiques moindres de l'association PROH 1,5M+sucrose, il nous a paru intéressant de la tester pour la congélation de tissu ovarien dans un but de culture. La comparaison des 2 populations à J4 montre de façon significative un plus grand pourcentage de follicules atrétiques pour le protocole PROH+sucrose par rapport au protocole DMSO 2M (86,3 % vs 61,9%, $p < 0,05$) et une baisse non significative des autres populations folliculaires (primordiaux, intermédiaires, primaires) (figure 45). Le protocole DMSO 2M, en théorie plus toxique pour la cellule que l'association PROH + sucrose semble pour cette étude se révéler au final un meilleur cryoprotecteur.

Comme pour le tissu frais, nous sommes confrontés à un problème de survie même si l'épaisseur de 1mm pour le tissu congelé semble globalement apporter des avantages par rapport à l'épaisseur 0,5mm. Après décongélation, il est possible que la perméabilité du cortex change, permettant une meilleure pénétration du milieu de culture malgré cette épaisseur de 1mm. Il est également possible pour le tissu congelé, qu'un certain nombre de cellules du stroma soient lysées par le processus de congélation/décongélation, et ainsi diminue la consommation du milieu par rapport au tissu frais pour un même volume de tissu.

Discussion des résultats chez l'humain

Le matériel humain étant une source rare, nos travaux n'ont pu être accomplis que sur quelques fragments disponibles, ce qui a limité le nombre d'échantillons et la durée de la culture.

Pour la culture d'ovaire adulte, le pourcentage moyen des follicules primordiaux a chuté de 67,7% (J0) à 36,8% (J8) $p < 0,05$ pendant que les follicules primaires ont augmenté de 7,9% (J0) à 14,8% à J4, jusqu'à 15,1% au 8e jour ($p = \text{NS}$). Le pourcentage moyen des follicules intermédiaires a augmenté de 14,7% à J0 à 23,3% à J8 ($p = \text{NS}$). Quelques follicules secondaires ont été retrouvés: 0,14% à J0, 0,18%, à J4 et 2,87%, à J8 ($p = \text{NS}$) (Tableau 17, Figure 49). Une initiation de croissance n'a pas pu être mise en évidence de façon significative même si elle semble se dessiner et ceci dès le 4^e jour. Ces résultats se rapprochent de ceux retrouvés par de nombreuses équipes chez l'humain (Hovatta *et al.* 1997; Hovatta *et al.* 1999; Wright *et al.* 1999; Louhio *et al.* 2000; Carlsson *et al.* 2006; Telfer *et al.* 2008), avec cependant, dans notre étude peu de follicules secondaires à J8 (2,87%). Contrairement à ces auteurs, notre milieu n'est pas supplémenté en facteurs de croissances ni en hormones, ce qui pourrait être une des explications à la faible proportion de follicules

secondaires observés. Ces résultats correspondent plutôt à ceux retrouvés chez la brebis par notre équipe. Il faudra poursuivre notre culture sur une plus longue période pour mettre en évidence une croissance folliculaire différente entre les 2 modèles.

Concernant l'immunomarquage, nous observons un marquage identique à celui retrouvé chez la brebis, permettant de penser que les expressions de GDF9 et BMP15 pour les deux espèces sont identiques en culture de tissu frais.

Concernant la culture *in vitro* de tissu ovarien foetal humain, nous observons une atresie assez marquée dès les premiers jours de culture : 10,6% de follicules atrétiques à J0, 45,2% dès le 2^e jour de culture et jusqu'à 46,8% de follicules atrétiques à J8. Cette atresie est plus marquée que celle observée dans l'étude de Sadeu et al (17,8% à J0 vs 19,8% à J63) (Sadeu et al. 2006). Cette différence peut être en relation avec le délai entre la mort des foetus et la mise en culture du tissu qui dépasse plusieurs heures. Nous avons observé une absence d'initiation de croissance des follicules sur 10 jours de culture. Ces observations sont en accord avec les travaux de Biron-Shental et al. : le tissu ovarien foetal humain après congélation/décongélation par un protocole lent, a une survie correcte en culture pendant 4 semaines mais aucune croissance n'est observée (Biron-Shental et al. 2004). *In vivo*, la croissance folliculaire nécessite plusieurs mois (Gougeon 1986). Concernant le tissu foetal, la culture doit sans doute se prolonger sur une période plus longue afin d'observer un début d'initiation de croissance. Pour Sadeu et al., après congélation/décongélation par un protocole lent, la croissance du tissu ne s'observe pas dans les premiers jours de culture. Il faut attendre 63 jours pour voir apparaître une évolution de la population folliculaire. De J35 à J63 les follicules primordiaux sont passés de 74,5 à 19,7% ; les follicules intermédiaires de 24,1 à 68,9%, les follicules primaires de 1,3 à 8,2% et les follicules secondaires de 0,1 à 3,3% respectivement (Sadeu et al. 2006).

Dans notre étude, selon les mêmes conditions de culture, aucune initiation nette de croissance n'est observée pour le tissu ovarien humain adulte mais semble se dessiner. Pour le tissu d'origine fœtal aucune entrée en croissance n'est constatée. Dans leur étude, Sadeu et al. retrouvent chez le fœtus un délai d'initiation plus tardif en culture. Ils évoquent comme cause possible, la différence de composition des milieux : les études chez l'adulte utilisent des milieux enrichis en facteur de croissance contrairement aux milieux utilisés dans leurs expériences.

Dans notre étude, les conditions de cultures sont identiques pour tous les tissus sans enrichissement en facteur de croissance. L'initiation de croissance des follicules primordiaux qui semble se dessiner chez l'adulte, peut s'expliquer par un environnement tissulaire en facteurs de croissance différent entre le fœtus et l'adulte. Cette hypothèse d'environnement non similaire avait déjà été envisagée par Gougeon et Busso qui avaient observé par immunohistochimie, un marquage distinct des facteurs de croissance entre le tissu fœtal et le tissu adulte chez le primate (Gougeon and Busso 2000). Elle a été confirmée par les travaux de Yang et Fortune qui ont trouvé, chez le bovin, un comportement différent des cortex de fœtus en culture. Les cortex de fœtus de moins de 140 jours de gestation ne sont pas activés en 2 jours de culture, et leurs ovocytes ne se sont pas au stade diplotène de la méiose. Pour les fœtus datant de plus de 140 jours, l'activation des follicules primordiaux est possible et leurs ovocytes sont pour 85% d'entre eux au stade diplotène (Yang and Fortune 2008).

Ces différences entre tissu adulte et tissu fœtal ont été retrouvées au niveau de la taille de chaque type folliculaire et ovocytaire (Tableau 18 à 21), mais elles n'ont pas été observées dans l'exploration des facteurs GDF9 et BMP15 et leurs récepteurs. Un marquage identique entre les tissus humains d'âges différents a été retrouvé (Figure 48 et 51).

La plupart des équipes dans le monde entier, suite aux succès présumés de l'autogreffe (Donnez *et al.* 2004; Meirow *et al.* 2005; Meirow *et al.* 2007; Andersen *et al.* 2008), utilise cette technique chez les patientes guéries de leur cancer mais les risques ne sont pas nuls : transmission de cellules cancéreuses par le greffon (Shaw *et al.* 1996) et transformation néoplasique du tissu ovarien greffé (Mueller *et al.* 2005). La culture malgré les difficultés rencontrées apparaît comme une solution qui limite ces risques, mais son innocuité n'est pas non plus totale. Le risque d'altération de la mise en place de l'empreinte parentale lors de la gamétogenèse existe, ce risque apparaît d'autant plus grand si la gamétogenèse est réalisée *in vitro* sur une période longue, du follicule primordial au follicule préovulatoire.

Dans notre laboratoire, nous travaillons en collaboration avec l'équipe d'Annick Lefèvre pour étudier l'effet de l'environnement immédiat des gamètes et en particulier la maturation *in vitro* ovocytaire sur l'épigénétique de l'ovocyte. De nombreuses observations indiquent un risque potentiel de voir apparaître, chez les enfants issus des techniques d'assistance médicale à la procréation, des maladies liées à un défaut d'empreinte parentale. L'empreinte parentale est un phénomène épigénétique qui régule et abouti à l'expression monoallelique de certains gènes selon leur origine parentale. Cette expression est régulée par une méthylation différentielle des résidus cytosine situés dans des dinucléotides CpG issus de régions appelées « differentially methylated regions » (DMR) (Reik and Walter 2001). Le phénomène d'empreinte parentale disparaît dans les cellules germinales primordiales dès les premiers jours de la vie fœtale et se rétablit en fonction du sexe durant la gamétogenèse. Parmi les pathologies décrites chez ces enfants sont retrouvées : le syndrome d'Angelman (Cox *et al.* 2002), le retinoblastome (Moll *et al.* 2003) et le syndrome de Beckwith-Wiedemann. Le risque de développer le syndrome de Beckwith-Wiedemann est 9 fois supérieur chez les enfants « AMP » que la population générale (Halliday *et al.* 2004).

Chez l'humain, la région KCNQ1OT1 est positionnée sur le chromosome 11p15.5 et est organisée en 2 domaines contrôlés par deux DMR distincts : DMR1 et KvDMR1. DMR1 est méthylé sur l'allèle paternel et régule l'expression de H19/IGF2 (Khosla *et al.* 2001; Rivera *et al.* 2008) ; KvDMR1 est localisé sur la région promoteur du gène non codant KCNQ1OT1 et est méthylé sur l'allèle maternel. KCNQ1OT1 est exprimé sur l'allèle paternel et régule négativement l'expression de plusieurs gènes maternels (Horike *et al.* 2000). La perte de méthylation (loss of methylation, LOM) a été observée dans 40 à 50% des cas sporadiques de syndrome de Beckwith-Wiedemann (Engel *et al.* 2000) et dans la majorité des cas des patients conçus par AMP (Gaston *et al.* 2001). Aucune cause d'infertilité précise, ni la stimulation ovarienne, ni la technique de fécondation employée, ni les protocoles de culture embryonnaire n'ont pu être mis en relation avec cette anomalie. Il apparaît important de rester vigilant quant à l'utilisation de la culture pour le développement folliculaire. La maturation *In vitro* (MIV) qui ne représente qu'une minime partie de la croissance folliculaire est réalisée sans aucune stimulation ovarienne : elle représente donc un bon modèle pour explorer l'impact éventuel de la culture sur la mise en place de l'empreinte parentale.

Notre équipe, avec celle d'Annick Lefèvre, a exploré le statut de méthylation de la région KvDMR1 sur des ovocytes qui ont été placés en MIV pendant 28 heures. Les ovocytes pour ceux issus de « vrai MIV » sans cycle stimulé ont été placés en maturation avec leur cumulus oophorus. Leur stade après 28 heures de MIV ont été observé après décoronisation : vésicule germinale (VG), métaphase I (MI) et métaphase II (MII). Les ovocytes des cycles stimulés étaient des VG issues de cycles de stimulation ovarienne utilisés pour des microinjections. Leur évolution après 28 heures de MIV ont également donnée : des VG, MI et MII.

Après 28h de MIV, les ovocytes au stade de VG, MI et MII issus de cycles stimulés présentent une perte de méthylation plus importante que les ovocytes au stade de VG et MI

issus des cycles naturels (les ovocytes au stade MII dans ce cas n'ont pu être étudiés car ils ont été utilisés pour la microinjection). Cette observation suggère que les ovocytes récupérés lors de cycle stimulé présentent une immaturité de développement qui ne sera pas compensée par le passage au stade de MII. Pour la MIV en cycle naturel, la méthylation a priori correcte observée des ovocytes au stade VG et MI laisse présager de la bonne mise en place de l'empreinte parentale pour les ovocytes en MII. Pour cette culture ovocytaire de 28h, ces observations sont plutôt en faveur de l'absence d'impact de la culture sur la mise en place de l'empreinte parentale au cours de la gamétogenèse. Mais une surveillance des enfants issus des MIV sera nécessaire pour éliminer tout risque. Les naissances après autogreffe issues de tissus ovariens cryoconservés nécessiteront également un suivi assidu des enfants.

Nôtus avons placé en maturation *in vitro* les ovocytes, pour ensuite les classer après 28h de culture selon les stades VG, MI et MII. Nous avons par la suite congelé ces ovocytes en suivant un protocole de congélation d'embryon. L'ensemble des données cliniques concernant l'origine des ces ovocytes a été colligées afin de mettre en évidence un éventuel lien entre l'âge, les indications cliniques, et les stratégies thérapeutique et la mise en place de l'empreinte. Rita Khoueiry et Samira Ibal-Rhomdane ont ensuite réalisé l'ensemble des techniques de biologie moléculaire afin de définir la mise en place de l'empreinte parentale au niveau du gène KCNQ1OT1 après la technique de maturation *in vitro*.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Concernant l'exploration de l'arrêt précoce de croissance observée, l'hypothèse d'un déficit qualitatif en GDF9 ou BMP15 dans nos cultures ne s'est pas vérifiée. L'analyse pourra être approfondie en quantifiant l'ARNm dans les ovocytes de GDF9 ou BMP15 à l'aide de PCR quantitative. Les cellules germinales pourront être isolées pour cette analyse par microdissection laser (Bocca *et al.* 2008). Cette étude serait menée en parallèle sur tissu frais et sur tissu congelé

Concernant la survie après congélation/décongélation, avant de débiter notre étude, nos deux principales hypothèses pour améliorer notre culture après congélation étaient les suivantes : augmenter l'épaisseur de notre tissu de 0,5mm (adapté à la culture) à 1mm (adapté à la congélation) ou modifier nos protocoles de congélation pour les adapter à un tissu de 0,5mm.

La première hypothèse testée a montré ses limites en terme de survie folliculaire en tissu frais mais la différence de comportement du tissu après congélation/décongélation nous permet de conserver cette épaisseur en culture de cortex congelé.

Pour nos futurs travaux nous allons explorer deux voies.

Nous allons conserver cette épaisseur de 1mm en tissu congelé en apportant des facteurs de survie folliculaire comme la FSH (Wright *et al.* 1999) ou la 8Br-GMPc (Scott *et al.* 2004) ou tester des support en co-culture après l'avoir améliorer en tissu frais. Parallèlement, nous allons mettre au point de nouveaux protocoles de congélation adaptés à une épaisseur de 0,5 mm de cortex. Les protocoles de congélation se baseront sur les protocoles déjà établis, mais

nous diminuerons la concentration des cryoprotecteurs. Notre équipe travaillant sur la vitrification, il sera envisageable d'utiliser les cortex d'ovaires vitrifiés et les tester en culture.

Une autre voie possible est de tester la culture d'ovaire entier maintenu sous perfusion. Cette dernière solution permet de conserver les interactions des différents types cellulaires au sein de l'organe complet et ainsi de conserver un apport complet des facteurs nécessaires : les facteurs du système vasculaire comme le Platelet Derived Growth Factor (Nilsson *et al.* 2006), et ceux du système nerveux comme le Glial Derived Neurotrophic Factor (Dole *et al.* 2008) qui ont montré un rôle dans la folliculogénèse basale. La plupart des auteurs considèrent le cortex ovarien comme étant le lieu de la folliculogénèse, la médullaire n'étant cantonnée qu'à un rôle de tissu de soutien. L'équipe de Sforza *et al.* a montré que la médullaire pouvait jouer un rôle important dans le développement des follicules pendant la mise en place de l'histogénèse ovarienne humaine (Sforza *et al.* 2003). De la vie fœtale à quelques jours de vie après la naissance, la distribution des différentes populations folliculaires n'est pas homogène au sein du cortex: en périphérie, une plus grande proportion de follicules primordiaux, puis en allant vers la médullaire, plus de follicules primaires et à proximité de la médullaire, un plus grand nombre de follicules secondaires et antraux. Ceci se réalise comme s'il existait un gradient de facteurs paracrines de la périphérie du cortex jusqu'à la médullaire, démontrant un rôle possible de la médullaire dans la folliculogénèse. En conservant l'organe en entier, il sera également envisageable de ponctionner les COC des follicules antraux et de les cultiver isolément, chez les grands mammifères la culture de COC semble en effet plus adaptée que la culture des follicules primordiaux au sein du cortex (Hirao *et al.* 2004).

Actuellement, de nombreuses interrogations existent encore quant aux mécanismes intimes qui régissent la croissance folliculaire précoce, les avancées concernant la folliculogénèse *in vivo* pourront être bénéfiques à la folliculogénèse *in vitro* et inversement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaltonen J, Laitinen M P, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L and Ritvos O (1999). "Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis." *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2744-50.
- Abir R, Fisch B, Nitke S, Okon E, Raz A and Ben Rafael Z (2001). "Morphological study of fully and partially isolated early human follicles." *Fertil Steril* 75: 141-6.
- Abir R, Franks S, Mobberley M A, Moore P A, Margara R A and Winston R M (1997). "Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles." *Fertil Steril* 68: 682-8.
- Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R and Ben Rafael Z (1999). "Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours." *Hum Reprod* 14: 1299-301.
- Amorim C A, Rondina D, Lucci C M, Giorgetti A, de Figueiredo J R and Goncalves P B (2007). "Cryopreservation of sheep primordial follicles." *Reprod Domest Anim* 42: 53-7.
- Amorim C A, Rondina D, Rodrigues A P, Goncalves P B, de Figueiredo J R and Giorgetti A (2004). "Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol." *Fertil Steril* 81 Suppl 1: 735-40.
- Andersen C Y, Rosendahl M, Byskov A G, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, Schmidt K L, Nyboe Andersen A and Ernst E (2008). "Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue." *Hum Reprod*.
- Ashwood-Smith M J and Friedmann G B (1979). "Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and x-irradiation on mammalian cells preserved at -196 degrees in dimethyl sulfoxide." *Cryobiology* 16: 132-40.
- Ataya K, Pydyn E, Ramahi-Ataya A and Orton C G (1995). "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 and Kimmel R (1995). "Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys." *Biol Reprod* 52: 365-72.
- Atkinson H G, Apperley J F, Dawson K, Goldman J M and Winston R M (1994). "Successful pregnancy after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia." *Lancet* 344: 199.
- Baker J W, Morgan R L, Peckham M J and Smithers D W (1972). "Preservation of ovarian function in patients requiring radiotherapy for para-aortic and pelvic Hodgkin's disease." *Lancet* 1: 1307-8.
- Baudot A, Alger L and Boutron P (2000). "Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide." *Cryobiology* 40: 151-8.
- Baudot A and Odagescu V (2004). "Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions." *Cryobiology* 48: 283-94.

- Bedaiwy M A, Hussein M R, Biscotti C and Falcone T (2006). "Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle." *Hum Reprod* 21: 3258-69.
- Ben-Haroush A, Abir R, Ao A, Jin S, Kessler-Icekson G, Feldberg D and Fisch B (2005). "Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses." *Fertil Steril* 84 Suppl 2: 1257-68.
- Biron-Shental T, Fisch B, Van Den Hurk R, Felz C, Feldberg D and Abir R (2004). "Survival of frozen-thawed human ovarian fetal follicles in long-term organ culture." *Fertil Steril* 81: 716-9.
- Blakewood E G, Pool S H, Prichard J F and Godke R A (1990). "Culturing two- to eight-cell caprine embryos using domestic chicken eggs." *Mol Reprod Dev* 27: 288-94.
- Blandau R, Warrick E and Rumery R E (1965). "In vitro cultivation of fetal mouse ovaries." *Fertil Steril* 16: 705-15.
- Blumenfeld Z and Eckman A (2005). "Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women by GnRH-a." *J Natl Cancer Inst Monogr*: 40-3.
- Bocca S M, Billiar R B, Albrecht E D and Pepe G J (2008). "Oocytes of baboon fetal primordial ovarian follicles express estrogen receptor beta mRNA." *Endocrine*.
- Bodensteiner K J, Clay C M, Moeller C L and Sawyer H R (1999). "Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries." *Biol Reprod* 60: 381-6.
- Bodensteiner K J, McNatty K P, Clay C M, Moeller C L and Sawyer H R (2000). "Expression of growth and differentiation factor-9 in the ovaries of fetal sheep homozygous or heterozygous for the inverdale prolificacy gene (FecX(I))." *Biol Reprod* 62: 1479-85.
- Borghol N, Lornage J, Blachere T, Sophie Garret A and Lefevre A (2006). "Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation." *Genomics* 87: 417-26.
- Boutron P (1986). "Comparison with the theory of the kinetics and extent of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions." *Cryobiology* 23: 88-102.
- Brown B W and Radziewicz T (1998). "Production of sheep embryos in vitro and development of progeny following single and twin embryo transfers." *Theriogenology* 49: 1525-36.
- Bukovsky A, Caudle M R, Svetlikova M and Upadhyaya N B (2004). "Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries." *Reprod Biol Endocrinol* 2: 20.
- Bukovsky A, Svetlikova M and Caudle M R (2005). "Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries." *Reprod Biol Endocrinol* 3: 17.
- 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 and et al. (1992). "Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence." *Am J Obstet Gynecol* 166: 788-93.
- Carlsson I B, Laitinen M P, Scott J E, Louhio H, Velentzis L, Tuuri T, Aaltonen J, Ritvos O, Winston R M and Hovatta O (2006). "Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture." *Reproduction* 131: 641-9.
- Carlsson I B, Scott J E, Visser J A, Ritvos O, Themmen A P and Hovatta O (2006). "Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro." *Hum Reprod* 21: 2223-7.
- Carroll J and Gosden R G (1993). "Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles." *Hum Reprod* 8: 1163-7.

- Cecconi S, Barboni B, Coccia M and Mattioli M (1999). "In vitro development of sheep preantral follicles." *Biol Reprod* 60: 594-601.
- Cecconi S, Capacchietti G, Russo V, Berardinelli P, Mattioli M and Barboni B (2004). "In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue." *Biol Reprod* 70: 12-7.
- Cha K Y, Koo J J, Ko J J, Choi D H, Han S Y and 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 H, Brown C W and Matzuk M M (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily." *Endocr Rev* 23: 787-823.
- Choi J, Lee J Y, Lee E, Yoon B K, Bae D and Choi D (2007). "Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development." *Cryobiology* 54: 55-62.
- Clark A T and Reijo Pera R A (2006). "Modeling human germ cell development with embryonic stem cells." *Regen Med* 1: 85-93.
- Constine L S, Woolf P D, Cann D, Mick G, McCormick K, Raubertas R F and Rubin P (1993). "Hypothalamic-pituitary dysfunction after radiation for brain tumors." *N Engl J Med* 328: 87-94.
- Cortvrint R, Smits J and Van Steirteghem A C (1996). "In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system." *Hum Reprod* 11: 2656-66.
- Courbiere B, Massardier J, Salle B, Mazoyer C, Guerin J F and 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, Odagescu V, Baudot A, Massardier J, Mazoyer C, Salle B and Lornage J (2006). "Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols." *Fertil Steril* 86 Suppl 4: 1243-51.
- Cox G F, Burger J, Lip V, Mau U A, Sperling K, Wu B L and Horsthemke B (2002). "Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects." *Am J Hum Genet* 71: 162-4.
- Czyba J C and Montella A (1993). *Biologie de la reproduction humaine*.
- Deanesly R (1954). "Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing." *J Endocrinol* 11: 197-200.
- Del Mastro L, Catzeddu T and Venturini M (2006). "Infertility and pregnancy after breast cancer: current knowledge and future perspectives." *Cancer Treat Rev* 32: 417-22.
- dela Pena E C, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay E C and Nagano M (2002). "Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles." *Reproduction* 123: 593-600.
- Demirci B (2002). *Autoconservation ovarienne chez la brebis. Evaluation d'un nouveau protocole de congélation. Initiation de la croissance folliculaire en culture in vitro avant et après congélation. Th Doctorat, Lyon 1.*
- Demirci B, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin J F and Lornage J (2002). "Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep." *Fertil Steril* 77: 595-600.
- d'Estaing S G, Lornage J, Hadj S, Bouliou D, Salle B and Guerin J F (2001). "Comparison of two blastocyst culture systems: coculture on Vero cells and sequential media." *Fertil Steril* 76: 1032-5.

- Di Pasquale E, Beck-Peccoz P and Persani L (2004). "Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene." *Am J Hum Genet* 75: 106-11.
- diZerega G S and Hodgen G D (1981). "Folliculogenesis in the primate ovarian cycle." *Endocr Rev* 2: 27-49.
- Dole G, Nilsson E E and Skinner M K (2008). "Glial-derived neurotrophic factor promotes ovarian primordial follicle development and cell-cell interactions during folliculogenesis." *Reproduction* 135: 671-82.
- Dong J, Albertini D F, Nishimori K, Kumar T R, Lu N and Matzuk M M (1996). "Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis." *Nature* 383: 531-5.
- Donnez J, Dolmans M M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B and van Langendonck A (2004). "Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue." *Lancet* 364: 1405-10.
- Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D and Dolmans M M (2006). "Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review." *Hum Reprod Update* 12: 519-35.
- Driancourt M A (2001). "Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction." *Theriogenology* 55: 1211-39.
- Driancourt M A, Cahill L P and Bindon B M (1985). "Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes." *J Reprod Fertil* 73: 93-107.
- Duffy D M (2003). "Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval." *Biol Reprod* 69: 725-32.
- Durlinger A L, Gruijters M J, Kramer P, Karels B, Ingraham H A, Nachtigal M W, Uilenbroek J T, Grootegoed J A and Themmen A P (2002). "Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary." *Endocrinology* 143: 1076-84.
- Durlinger A L, Kramer P, Karels B, de Jong F H, Uilenbroek J T, Grootegoed J A and Themmen A P (1999). "Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary." *Endocrinology* 140: 5789-96.
- Eckery D C, Whale L J, Lawrence S B, Wylde K A, McNatty K P and Juengel J L (2002). "Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*)." *Mol Cell Endocrinol* 192: 115-26.
- Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min I M and Wagers A J (2006). "Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells." *Nature* 441: 1109-14.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin A S, Biramane J and Englert Y (2000). "Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts." *Hum Reprod* 15: 905-10.
- Engel J R, Smallwood A, Harper A, Higgins M J, Oshimura M, Reik W, Schofield P N and Maher E R (2000). "Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome." *J Med Genet* 37: 921-6.
- Eppig J J (2001). "Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals." *Reproduction* 122: 829-38.
- Eppig J J and O'Brien M J (1996). "Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles." *Biol Reprod* 54: 197-207.

- Faddy M J, Gosden R G, Gougeon A, Richardson S J and Nelson J F (1992). "Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause." *Hum Reprod* 7: 1342-6.
- Fahy G M, Wowk B, Wu J and Paynter S (2004). "Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity." *Cryobiology* 48: 22-35.
- Familiari G, Caggiati A, Nottola S A, Ermini M, Di Benedetto M R and Motta P M (1993). "Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease." *Hum Reprod* 8: 2080-7.
- Fisher B, Sherman B, Rockette H, Redmond C, Margolese R and Fisher E R (1979). "1-phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of premenopausal patients with primary breast cancer: lack of association of disease-free survival with depression of ovarian function. National Surgical Adjuvant Project for Breast and Bowel Cancers." *Cancer* 44: 847-57.
- Fitzpatrick S L, Sindoni D M, Shughrue P J, Lane M V, Merchenthaler I J and Frail D E (1998). "Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues." *Endocrinology* 139: 2571-8.
- Fosdick W M, Parsons J L and Hill D F (1968). "Long-term cyclophosphamide therapy in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 11: 151-61.
- Fukui Y, McGowan L T, James R W, Pugh P A and Tervit H R (1991). "Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro." *J Reprod Fertil* 92: 125-31.
- Galloway S M, McNatty K P, Cambridge L M, Laitinen M P, Juengel J L, Jokiranta T S, McLaren R J, Luiro K, Dodds K G, Montgomery G W, Beattie A E, Davis G H and Ritvos O (2000). "Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner." *Nat Genet* 25: 279-83.
- Gaston V, Le Bouc Y, Soupre V, Burglen L, Donadieu J, Oro H, Audry G, Vazquez M P and Gicquel C (2001). "Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome." *Eur J Hum Genet* 9: 409-18.
- George M A, Pickering S J, Braude P R and Johnson M H (1996). "The distribution of alpha- and gamma-tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant." *Mol Hum Reprod* 2: 445-56.
- Giuseppe L, Attilio G, Edoardo D N, Loredana G, Cristina L and Vincenzo L (2007). "Ovarian function after cancer treatment in young women affected by Hodgkin disease (HD)." *Hematology* 12: 141-7.
- Goddard I, Bauer S, Gougeon A, Lopez F, Giannetti N, Susini C, Benahmed M and Krantic S (2001). "Somatostatin inhibits stem cell factor messenger RNA expression by Sertoli cells and stem cell factor-induced DNA synthesis in isolated seminiferous tubules." *Biol Reprod* 65: 1732-42.
- Gook D A, McCully B A, Edgar D H and McBain J C (2001). "Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting." *Hum Reprod* 16: 417-22.
- Gosden R G, Baird D T, Wade J C and Webb R (1994). "Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C." *Hum Reprod* 9: 597-603.

- Gosden R G, Wade J C, Fraser H M, Sandow J and Faddy M J (1997). "Impact of congenital or experimental hypogonadotrophism on the radiation sensitivity of the mouse ovary." *Hum Reprod* 12: 2483-8.
- Gougeon A (1986). "Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results." *Hum Reprod* 1: 81-7.
- Gougeon A (2005). *Croissance et maturation folliculaires, ovulation. Traité de Gynécologie.* Flammarion: 8-19.
- Gougeon A and Busso D (2000). "Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary." *Mol Cell Endocrinol* 163: 33-42.
- Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E and D J A (2004). "Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study." *Am J Hum Genet* 75: 526-8.
- Hamre M R, Robison L L, Nesbit M E, Sather H N, Meadows A T, Ortega J A, D'Angio G J and 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.
- Hanrahan J P, Gregan S M, Mulsant P, Mullen M, Davis G H, Powell R and Galloway S M (2004). "Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*)." *Biol Reprod* 70: 900-9.
- Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T and Koyama K (2006). "Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization." *Fertil Steril* 86 Suppl 4: 1182-92.
- Himelstein-Braw R, Peters H and Faber M (1978). "Morphological study of the ovaries of leukaemic children." *Br J Cancer* 38: 82-7.
- Hirao Y, Itoh T, Shimizu M, Iga K, Aoyagi K, Kobayashi M, Kacchi M, Hoshi H and Takenouchi N (2004). "In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium." *Biol Reprod* 70: 83-91.
- Hirshfield A N (1991). "Development of follicles in the mammalian ovary." *Int Rev Cytol* 124: 43-101.
- Horike S, Mitsuya K, Meguro M, Kotobuki N, Kashiwagi A, Notsu T, Schulz T C, Shirayoshi Y and Oshimura M (2000). "Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome." *Hum Mol Genet* 9: 2075-83.
- Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T and 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.
- Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K and Winston R M (1999). "Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation." *Hum Reprod* 14: 2519-24.
- Hoyer P E, Byskov A G and Mollgard K (2005). "Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries." *Mol Cell Endocrinol* 234: 1-10.
- Hreinsson J G, Scott J E, Rasmussen C, Swahn M L, Hsueh A J and Hovatta O (2002). "Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture." *J Clin Endocrinol Metab* 87: 316-21.
- Hsu S Y, Kubo M, Chun S Y, Haluska F G, Housman D E and Hsueh A J (1995). "Wilms' tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in expression during

- follicle development and repression of inhibin-alpha gene promoter." *Mol Endocrinol* 9: 1356-66.
- Huang J Y, Tulandi T, Holzer H, Tan S L and Chian R C (2007). "Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation." *Fertil Steril*.
- Hutt K J, McLaughlin E A and Holland M K (2006). "KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth." *Biol Reprod* 75: 421-33.
- Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G and Huber J (2006). "Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth." *Fertil Steril* 85 Suppl 1: 1208-15.
- Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G and Nawroth F (2003). "Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108: 186-93.
- Isachenko V, Montag M, Isachenko E, van der Ven K, Dorn C, Roesing B, Braun F, Sadek F and van der Ven H (2006). "Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue." *Reprod Biomed Online* 13: 228-34.
- Jaatinen R, Laitinen M P, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E and Ritvos O (1999). "Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B." *Mol Cell Endocrinol* 156: 189-93.
- Jacox H W (1939). "Recovery following human ovum irradiation." *Radiology* 32: 538-45.
- Jainudeen M R and Hafez E Z (1993). *Sheep and Goats, In Reproduction in farm animals.*
- Janny L, Vye P, Pouly J L, Hazout A, Dumont M, Nicollet B and Menezo Y (1993). "[Cocultures: diagnostic and therapeutic value]." *Contracept Fertil Sex* 21: 391-4.
- Jayot S, Parneix I, Verdaguer S, Discamps G, Audebert A and Emperaire J C (1995). "Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation." *Fertil Steril* 63: 109-14.
- Jin X, Han C S, Yu F Q, Wei P, Hu Z Y and Liu Y X (2005). "Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction." *Mol Reprod Dev* 70: 82-90.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee H J, Adams G B, Niikura Y, Tschudy K S, Tilly J C, Cortes M L, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden D T and Tilly J L (2005). "Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood." *Cell* 122: 303-15.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru J K and Tilly J L (2004). "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary." *Nature* 428: 145-50.
- Juengel J L, Hudson N L, Whiting L and McNatty K P (2004). "Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes." *Biol Reprod* 70: 557-61.
- Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, Vajta G, Silber S, Manabe N and Kato O (2007). "Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice." *Reprod Biomed Online* 14: 693-9.
- Kaivo-Oja N, Bondestam J, Kamarainen M, Koskimies J, Vitt U, Cranfield M, Vuojolainen K, Kallio J P, Olkkonen V M, Hayashi M, Moustakas A, Groome N P, ten Dijke P, Hsueh A J and Ritvos O (2003). "Growth differentiation factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells." *J Clin Endocrinol Metab* 88: 755-62.

- Karlsson J O and Toner M (1996). "Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues." *Biomaterials* 17: 243-56.
- Kerjean A, Couvert P, Heams T, Chalas C, Poirier K, Chelly J, Jouannet P, Paldi A and Poirot C (2003). "In vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice." *Eur J Hum Genet* 11: 493-6.
- Kezele P, Nilsson E E and Skinner M K (2005). "Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition." *Biol Reprod* 73: 967-73.
- Khosla S, Dean W, Reik W and Feil R (2001). "Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype." *Hum Reprod Update* 7: 419-27.
- Kim S S, Battaglia D E and Soules M R (2001). "The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond." *Fertil Steril* 75: 1049-56.
- Knight P G and Glister C (2006). "TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development." *Reproduction* 132: 191-206.
- Kovanci E, Rohozinski J, Simpson J L, Heard M J, Bishop C E and Carson S A (2007). "Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure." *Fertil Steril* 87: 143-6.
- Ksiazkiewicz L K (2006). "Recent achievements in in vitro culture and preservation of ovarian follicles in mammals." *Reprod Biol* 6: 3-16.
- Kuleshova L L, MacFarlane D R, Trounson A O and Shaw J M (1999). "Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes." *Cryobiology* 38: 119-30.
- Lacham-Kaplan O, Chy H and Trounson A (2006). "Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes." *Stem Cells* 24: 266-73.
- Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M and Ritvos O (1998). "A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis." *Mech Dev* 78: 135-40.
- Land R B, Pelletier J, Thimonier J and Mauleon P (1973). "A quantitative study of genetic differences in the incidence of oestrus, ovulation and plasma luteinizing hormone concentration in the sheep." *J Endocrinol* 58: 305-17.
- Le Du A, Kadoch I J, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier M C, Chevalier N, Fanchin R, Chian R C, Tachdjian G, Frydman R and Frydman N (2005). "In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience." *Hum Reprod* 20: 420-4.
- Lee W S, Otsuka F, Moore R K and Shimasaki S (2001). "Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat." *Biol Reprod* 65: 994-9.
- Leporrier M, von Theobald P, Roffe J L and Muller G (1987). "A new technique to protect ovarian function before pelvic irradiation. Heterotopic ovarian autotransplantation." *Cancer* 60: 2201-4.
- Li Y B, Zhou C Q, Yang G F, Wang Q and Dong Y (2007). "Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues." *Chin Med J (Engl)* 120: 110-4.
- Liao W X, Moore R K, Otsuka F and Shimasaki S (2003). "Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep." *J Biol Chem* 278: 3713-9.

- Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R and Dhont M (2001). "Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation." *Biol Reprod* 64: 171-8.
- Liu J, Van Der Elst J, Van Den Broecke R, Dumortier F and Dhont M (2000). "Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture." *Biol Reprod* 62: 1218-23.
- Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G and Reddy P (2006). "Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer." *Dev Biol* 299: 1-11.
- Lornage J (1994). *Congélation et cryoconservation des embryons humains*. Th Doctorat. Lyon I.
- Lornage J (2006). "[In vitro maturation: the French experience]." *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 35: 2S3-2S7.
- Lornage J, Chorier H, Bouliou D, Mathieu C and Czyba J C (1995). "Six year follow-up of cryopreserved human embryos." *Hum Reprod* 10: 2610-6.
- Louhio H, Hovatta O, Sjoberg J and Tuuri T (2000). "The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture." *Mol Hum Reprod* 6: 694-8.
- Louis J, Limarzi L R and Best W R (1956). "Treatment of chronic granulocytic leukemia with myleran." *AMA Arch Intern Med* 97: 299-308.
- Loutradis D, John D and Kiessling A A (1987). "Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos." *Biol Reprod* 37: 311-6.
- Lushbaugh C C and Casarett G W (1976). "The effects of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: a review." *Cancer* 37: 1111-25.
- Maguiness S D, Djahanbakhch O and Grudzinskas J G (1992). "Assessment of the fallopian tube." *Obstet Gynecol Surv* 47: 587-603.
- Maltaris T, Seufert R, Fischl F, Schaffrath M, Pollow K, Koelbl H and Dittrich R (2007). "The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 130: 148-55.
- Martinez-Madrid B, Camboni A, Dolmans M M, Nottola S, Van Langendonck A and Donnez J (2007). "Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle." *Fertil Steril* 87: 1153-65.
- Mazerbourg S, Klein C, Roh J, Kaivo-Oja N, Mottershead D G, Korchynskyi O, Ritvos O and Hsueh A J (2004). "Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5." *Mol Endocrinol* 18: 653-65.
- Mazur P (1984). "Freezing of living cells: mechanisms and implications." *Am J Physiol* 247: C125-42.
- Mazur P, Miller R H and Leibo S P (1974). "Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose." *J Membr Biol* 15: 137-58.
- Meirow D (1999). "Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers." *Leuk Lymphoma* 33: 65-76.
- Meirow D (2000). "Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients." *Mol Cell Endocrinol* 169: 123-31.
- Meirow D, Assad G, Dor J and Rabinovici J (2004). "The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice." *Hum Reprod* 19: 1294-9.

- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Yemini Z and Dor J (2007). "Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, in vitro fertilization cycles, and live birth." *Fertil Steril* 87: 418 e7-e15.
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E and 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 and 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 and Nugent D (2001). "The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction." *Hum Reprod Update* 7: 535-43.
- Mery L, Lefevre A, Benchaib M, Demirci B, Salle B, Guerin J F and Lornage J (2006). "Follicular growth in vitro: detection of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) during in vitro culture of ovine cortical slices." *Mol Reprod Dev*.
- Meryman H T (1966). "The interpretation of freezing rates in biological materials." *Cryobiology* 2: 165-70.
- Mok C C, Lau C S and Wong R W (1998). "Risk factors for ovarian failure in patients with systemic lupus erythematosus receiving cyclophosphamide therapy." *Arthritis Rheum* 41: 831-7.
- Moll A C, Imhof S M, Cruysberg J R, Schouten-van Meeteren A Y, Boers M and van Leeuwen F E (2003). "Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation." *Lancet* 361: 309-10.
- Moniruzzaman M and Miyano T (2007). "KIT-KIT ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles." *J Reprod Dev* 53: 1273-81.
- Moore R K, Otsuka F and Shimasaki S (2003). "Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells." *J Biol Chem* 278: 304-10.
- 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 and 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.
- Mueller A, Maltaris T, Dimmler A, Hoffmann I, Beckmann M W and Dittrich R (2005). "Development of sex cord stromal tumors after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue in rats." *Anticancer Res* 25: 4107-11.
- Muggleton-Harris A L, Findlay I and Whittingham D G (1990). "Improvement of the culture conditions for the development of human preimplantation embryos." *Hum Reprod* 5: 217-20.
- Muruvi W, Picton H M, Rodway R G and Joyce I M (2005). "In vitro growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries." *Theriogenology* 64: 1357-70.
- Muruvi W, Picton H M, Rodway R G and Joyce I M (2008). "In vitro growth and differentiation of primary follicles isolated from cryopreserved sheep ovarian tissue." *Anim Reprod Sci*.
- Nagy Z P and Chang C C (2005). "Current advances in artificial gametes." *Reprod Biomed Online* 11: 332-9.
- Nayernia K, Nolte J, Michelmann H W, Lee J H, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann I E, Elliott D J, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A and Engel

- W (2006). "In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice." *Dev Cell* 11: 125-32.
- Newton H, Picton H and Gosden R G (1999). "In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue." *J Reprod Fertil* 115: 141-50.
- Nilsson E, Parrott J A and Skinner M K (2001). "Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis." *Mol Cell Endocrinol* 175: 123-30.
- Nilsson E E, Detzel C and Skinner M K (2006). "Platelet-derived growth factor modulates the primordial to primary follicle transition." *Reproduction* 131: 1007-15.
- Nilsson E E, Kezele P and Skinner M K (2002). "Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries." *Mol Cell Endocrinol* 188: 65-73.
- Nilsson E E and Skinner M K (2003). "Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development." *Biol Reprod* 69: 1265-72.
- O'Brien M J, Pendola J K and Eppig J J (2003). "A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence." *Biol Reprod* 68: 1682-6.
- Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O and Gosden R G (1998). "Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology?" *Fertil Steril* 69: 1-7.
- Ortin T T, Shostak C A and Donaldson S S (1990). "Gonadal status and reproductive function following treatment for Hodgkin's disease in childhood: the Stanford experience." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19: 873-80.
- Otsuka F, Moore R K, Iemura S, Ueno N and Shimasaki S (2001). "Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15." *Biochem Biophys Res Commun* 289: 961-6.
- Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J and Menezo Y (1990). "Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports." *Hum Reprod* 5: 737-43.
- Packer A I, Hsu Y C, Besmer P and Bachvarova R F (1994). "The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth." *Dev Biol* 161: 194-205.
- Paris F, Perez G I, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Nguyen H, Bose M, Ilagan A, Hunt P A, Morgan W F, Tilly J L and Kolesnick R (2002). "Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring." *Nat Med* 8: 901-2.
- Parkes A S and Smith A U (1953). "Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140: 455-70.
- Parrott D M (1960). "The fertility of mice with orthoptic ovarian grafts." *J. Reprod. Fertil.* 1: 230-41.
- Parrott J A and Skinner M K (1999). "Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis." *Endocrinology* 140: 4262-71.
- Payer B, Chuva de Sousa Lopes S M, Barton S C, Lee C, Saitou M and Surani M A (2006). "Generation of stella-GFP transgenic mice: a novel tool to study germ cell development." *Genesis* 44: 75-83.
- Paynter S J, Cooper A, Fuller B J and Shaw R W (1999). "Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro." *Cryobiology* 38: 301-9.

- Pegg D E (2002). "The history and principles of cryopreservation." *Semin Reprod Med* 20: 5-13.
- Pegg D E, Wusteman M C and Boylan S (1997). "Fractures in cryopreserved elastic arteries." *Cryobiology* 34: 183-92.
- Perez G I, Knudson C M, Leykin L, Korsmeyer S J and Tilly J L (1997). "Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction." *Nat Med* 3: 1228-32.
- Peters H, Byskov A G, Lintern-Moore S and Faber M (1973). "Proceedings: Follicle growth initiation in the immature mouse ovary: extraovarian or intraovarian control?" *J Reprod Fertil* 35: 619-20.
- Picton H M (2001). "Activation of follicle development: the primordial follicle." *Theriogenology* 55: 1193-210.
- Plachot M, Antoine J M, Alvarez S, Firmin C, Pfister A, Mandelbaum J, Junca A M and Salat-Baroux J (1993). "Granulosa cells improve human embryo development in vitro." *Hum Reprod* 8: 2133-40.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti P M, Venturoli S and Flamigni C (2000). "Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation." *Mol Cell Endocrinol* 169: 33-7.
- Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti P M, Magrini O and Flamigni C (1997). "Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes." *Fertil Steril* 68: 724-6.
- Porcu E and Venturoli S (2006). "Progress with oocyte cryopreservation." *Curr Opin Obstet Gynecol* 18: 273-9.
- Pru J K and Tilly J L (2001). "Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies." *Mol Endocrinol* 15: 845-53.
- Rall W F and Fahy G M (1985). "Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification." *Nature* 313: 573-5.
- Rall W F, Wood M J, Kirby C and Whittingham D G (1987). "Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification." *J Reprod Fertil* 80: 499-504.
- Reik W and Walter J (2001). "Genomic imprinting: parental influence on the genome." *Nat Rev Genet* 2: 21-32.
- Rivera R M, Stein P, Weaver J R, Mager J, Schultz R M and Bartolomei M S (2008). "Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development." *Hum Mol Genet* 17: 1-14.
- Roelen B A, Cohen O S, Raychowdhury M K, Chadee D N, Zhang Y, Kyriakis J M, Alessandrini A A and Lin H Y (2003). "Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation." *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C823-30.
- Roh J S, Bondestam J, Mazerbourg S, Kaivo-Oja N, Groome N, Ritvos O and Hsueh A J (2003). "Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates Smad2 in cultured rat granulosa cells." *Endocrinology* 144: 172-8.
- Roy S K and Treacy B J (1993). "Isolation and long-term culture of human preantral follicles." *Fertil Steril* 59: 783-90.
- Sadeu J C, Adriaenssens T, Smits J. (2008) "Expression of growth differentiation factor 9, bone morphogenetic protein 15, and anti-Müllerian hormone in cultured mouse primary follicles". *Reproduction* 136:195-203.

- Sadeu J C and Smitz J (2008). "Growth differentiation factor-9 and anti-Müllerian hormone expression in cultured human follicles from frozen-thawed ovarian tissue" *Reprod biomed on line*.
- Sadeu J C, Cortvrindt R, Ron-El R, Kasterstein E and Smitz J (2006). "Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue." *Fertil Steril* 85 Suppl 1: 1130-41.
- Salle B, Demirci B, Franck M, Berthollet C and Lornage J (2003). "Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment." *Fertil Steril* 80: 172-7.
- Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz R C, Guerin J F and Lornage J (2002). "Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes." *Fertil Steril* 77: 403-8.
- Santos R R, Rodrigues A P, Costa S H, Silva J R, Matos M H, Lucci C M, Bao S N, van den Hurk R and Figueiredo J R (2006). "Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles." *Anim Reprod Sci* 91: 249-63.
- Santos R R, van den Hurk R, Rodrigues A P, Costa S H, Martins F S, Matos M H, Celestino J J and Figueiredo J R (2007). "Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles." *Anim Reprod Sci* 99: 53-64.
- Saxe A W, Gibson G W and Kay S (1990). "Characterization of a simplified method of cryopreserving human parathyroid tissue." *Surgery* 108: 1033-8; discussion 8-9.
- Schmidt K L, Kryger-Baggesen N, Byskov A G and Andersen C Y (2005). "Anti-Müllerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro." *Mol Cell Endocrinol* 234: 87-93.
- Schubert B (2007). *Effets de la cryoconservation du cortex ovarien humain sur la maturation folliculaire. Etudes in vitro et in vivo. Th Doctorat Université d'Auvergne 2007.*
- Schubert B, Canis M, Darcha C, Artonne C, Smitz J and Grizard G (2008). "Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue." *Fertil Steril* 89: 1787-94.
- Scott J E, Zhang P and Hovatta O (2004). "Benefits of 8-bromo-guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-br-cGMP) in human ovarian cortical tissue culture." *Reprod Biomed Online* 8: 319-24.
- Segino M, Ikeda M, Hirahara F and Sato K (2005). "In vitro follicular development of cryopreserved mouse ovarian tissue." *Reproduction* 130: 187-92.
- Sforza C, Vizzotto L, Ferrario V F and Forabosco A (2003). "Position of follicles in normal human ovary during definitive histogenesis." *Early Hum Dev* 74: 27-35.
- Shaw J M, Bowles J, Koopman P, Wood E C and 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.
- Shimasaki S, Moore R K, Otsuka F and Erickson G F (2004). "The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction." *Endocr Rev* 25: 72-101.
- Silva J R, van den Hurk R, Costa S H, Andrade E R, Nunes A P, Ferreira F V, Lobo R N and Figueiredo J R (2004). "Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water." *Anim Reprod Sci* 81: 273-86.
- Silva J R, van den Hurk R, de Matos M H, dos Santos R R, Pessoa C, de Moraes M O and de Figueiredo J R (2004). "Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue." *Theriogenology* 61: 1691-704.

- Silva J R, van den Hurk R, van Tol H T, Roelen B A and Figueiredo J R (2005). "Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats." *Mol Reprod Dev* 70: 11-9.
- Skaznik-Wikiel M, Tilly J C, Lee H J, Niikura Y, Kaneko-Tarui T, Johnson J and Tilly J L (2007). "Serious doubts over "Eggs forever?"" *Differentiation* 75: 93-9.
- Skinner M K (2005). "Regulation of primordial follicle assembly and development." *Hum Reprod Update* 11: 461-71.
- Smallwood M, Worrall D, Byass L, Elias L, Ashford D, Doucet C J, Holt C, Telford J, Lillford P and Bowles D J (1999). "Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*)." *Biochem J* 340 (Pt 2): 385-91.
- Smitz J E and Cortvrindt R G (2002). "The earliest stages of folliculogenesis in vitro." *Reproduction* 123: 185-202.
- Soderstrom-Anttila V, Makinen S, Tuuri T and Suikkari A M (2005). "Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients." *Hum Reprod* 20: 1534-40.
- Solary E, Plenchette S, Sordet O, Rebe C, Ducoroy P, Filomenko R, Bruey J M, Droin N and Corcos L (2001). "Modulation of apoptotic pathways triggered by cytotoxic agents." *Therapie* 56: 511-8.
- Sonmezer M and Oktay K (2004). "Fertility preservation in female patients." *Hum Reprod Update* 10: 251-66.
- Sonmezer M and Oktay K (2006). "Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy." *Oncologist* 11: 422-34.
- Sugimoto M, Maeda S, Manabe N and Miyamoto H (2000). "Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification." *Theriogenology* 53: 1093-103.
- Teixeira Filho F L, Baracat E C, Lee T H, Suh C S, Matsui M, Chang R J, Shimasaki S and Erickson G F (2002). "Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1337-44.
- Telfer E E (1998). "In vitro models for oocyte development." *Theriogenology* 49: 451-60.
- Telfer E E, Gosden R G, Byskov A G, Spears N, Albertini D, Andersen C Y, Anderson R, Braw-Tal R, Clarke H, Gougeon A, McLaughlin E, McLaren A, McNatty K, Schatten G, Silber S and Tsafiri A (2005). "On regenerating the ovary and generating controversy." *Cell* 122: 821-2.
- Telfer E E, McLaughlin M, Ding C and Thong K J (2008). "A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin." *Hum Reprod* 23: 1151-8.
- Thibaud E, Rodriguez-Macias K, Trivin C, Esperou H, Michon J and Brauner R (1998). "Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood." *Bone Marrow Transplant* 21: 287-90.
- Tilly J L and Kolesnick R N (2003). "Realizing the promise of apoptosis-based therapies: separating the living from the clinically undead." *Cell Death Differ* 10: 493-5.
- Trounson A, Wood C and Kausche A (1994). "In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients." *Fertil Steril* 62: 353-62.
- Tsonis C G, Cahill L P, Carson R S and Findlay J K (1984). "Identification at the onset of luteolysis of follicles capable of ovulation in the ewe." *J Reprod Fertil* 70: 609-14.

- Verheij M and Bartelink H (2000). "Radiation-induced apoptosis." *Cell Tissue Res* 301: 133-42.
- Vitt U A, Mazerbourg S, Klein C and Hsueh A J (2002). "Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9." *Biol Reprod* 67: 473-80.
- Viviani S, Santoro A, Ragni G, Bonfante V, Bestetti O and Bonadonna G (1985). "Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Comparative results of MOPP vs ABVD." *Eur J Cancer Clin Oncol* 21: 601-5.
- Wallace W H, Shalet S M, Hendry J H, Morris-Jones P H and Gattamaneni H R (1989). "Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte." *Br J Radiol* 62: 995-8.
- Wallace W H, Shalet S M, Tetlow L J and Morris-Jones P H (1993). "Ovarian function following the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia." *Med Pediatr Oncol* 21: 333-9.
- Wallace W H, Thomson A B and Kelsey T W (2003). "The radiosensitivity of the human oocyte." *Hum Reprod* 18: 117-21.
- Wallace W H, Thomson A B, Saran F and Kelsey T W (2005). "Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62: 738-44.
- Wandji S A, Srsen V, Nathanielsz P W, Eppig J J and Fortune J E (1997). "Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro." *Hum Reprod* 12: 1993-2001.
- Wandji S A, Srsen V, Voss A K, Eppig J J and Fortune J E (1996). "Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles." *Biol Reprod* 55: 942-8.
- Wang C, Ng R P, Chan T K and Todd D (1980). "Effect of combination chemotherapy on pituitary-gonadal function in patients with lymphoma and leukemia." *Cancer* 45: 2030-7.
- Wang J and Roy S K (2004). "Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone." *Biol Reprod* 70: 577-85.
- Wang X, Chen H, Yin H, Kim S S, Lin Tan S and Gosden R G (2002). "Fertility after intact ovary transplantation." *Nature* 415: 385.
- Waxman J H, Ahmed R, Smith D, Wrigley P F, Gregory W, Shalet S, Crowther D, Rees L H, Besser G M, Malpas J S and et al. (1987). "Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease." *Cancer Chemother Pharmacol* 19: 159-62.
- Wharton D and Ferns D (1995). "Survival of intracellular freezing by the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*." *J Exp Biol* 198: 1381-7.
- Whitehead E, Shalet S M, Jones P H, Beardwell C G and Deakin D P (1982). "Gonadal function after combination chemotherapy for Hodgkin's disease in childhood." *Arch Dis Child* 57: 287-91.
- Wiemer K E, Cohen J, Wiker S R, Malter H E, Wright G and Godke R A (1989). "Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation." *Fertil Steril* 52: 503-8.
- Wright C S, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston R M, Franks S and Hardy K (1999). "Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles." *Hum Reprod* 14: 1555-62.
- Wu J, Carrell D T and Wilcox A L (2001). "Development of in vitro-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection." *Biol Reprod* 65: 1579-85.

- Xu K P, Yadav B R, Rorie R W, Plante L, Betteridge K J and King W A (1992). "Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells." *J Reprod Fertil* 94: 33-43.
- Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S and Miyano T (1999). "Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro." *Theriogenology* 52: 81-9.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo F J, Elvin J A, Carino C, Prasad S V, Skinner S S, Dunbar B S, Dube J L, Celeste A J and Matzuk M M (2001). "Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function." *Mol Endocrinol* 15: 854-66.
- Yang M Y and Fortune J E (2008). "The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes." *Biol Reprod* 78: 1153-61.
- Yeoman R R, Wolf D P and Lee D M (2005). "Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing." *Fertil Steril* 83 Suppl 1: 1248-54.

ANNEXES
