



HAL
open science

**Qualification biologique des greffons de tissu ovarien
autoconservé. : contribution à la codification des
techniques de réutilisation en cas de pathologie
néoplasique**

Elodie Mouti Mouloungui

► **To cite this version:**

Elodie Mouti Mouloungui. Qualification biologique des greffons de tissu ovarien autoconservé. : contribution à la codification des techniques de réutilisation en cas de pathologie néoplasique. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCE008 . tel-01957248

HAL Id: tel-01957248

<https://theses.hal.science/tel-01957248>

Submitted on 17 Dec 2018

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 DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'EFS BOURGOGNE FRANCHE-COMTE (UMR 1098)**

Ecole doctorale

Environnement-Santé

Doctorat de Biologie de la Santé

Par

Elodie Mouti Mouloungui

Qualification biologique des greffons de tissu ovarien autoconservé. Contribution à la codification des techniques de réutilisation en cas de pathologie néoplasique.

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 25 mai 2018

Composition du Jury :

Mme, BRUGNON, Florence	Professeur, CHU Clermont Ferrand	Présidente
Mme, POIROT, Catherine	Professeur, Hôpital Saint Louis, Paris	Rapporteur
Mme, BRUGNON, Florence	Professeur, CHU Clermont Ferrand	Rapporteur
Mr, ROUX, Christophe	Professeur, CHRU Jean Minjoz	Directeur de thèse
Mme, AMIOT, Clotilde	Docteur, CHRU Jean Minjoz	Co-directrice de thèse

Titre : Qualification biologique des greffons de tissu ovarien autoconservé. Contribution à la codification des techniques de réutilisation en cas de pathologie néoplasique.

Mots clés : Collagénase NB6, bonnes pratiques de fabrication, follicules ovariens isolés, purification, cellules leucémiques.

Résumé : La cryoconservation de cortex ovarien est la seule technique envisageable pour les patientes pré-pubères et les femmes dont la pathologie nécessite l'administration d'un traitement hautement gonadotoxique dont l'initiation ne peut être différée. L'autotransplantation est jusqu'à présent la seule méthode disponible de réutilisation du tissu ovarien cryoconservé, et a permis d'obtenir plus de 130 naissances dans le monde, dont trois au CHRU de Besançon. Toutefois, en cas de pathologie néoplasique à risque de localisation métastatique ovarienne, cette technique peut présenter un risque de réintroduction de cellules malignes susceptibles d'être présentes dans le greffon. Des méthodes alternatives à l'autogreffe de tissu ovarien cryopréservé fondées sur l'utilisation de follicules ovariens isolés sont actuellement en développement. L'objectif de cette thèse a été de développer un protocole permettant l'isolement et la qualification de follicules ovariens qui pourront être utilisés en thérapie cellulaire à usage humain. Dans un premier temps, une validation de la technique d'isolement de follicules ovariens a été réalisée à partir de la dissociation de fragments de cortex ovarien, issus de patientes ayant subi une résection percoelioscopique,

à l'aide d'une collagénase NB6 produite selon les bonnes pratiques de fabrication. Les follicules ainsi obtenus ont été analysés en termes de viabilité (immédiate et après culture *in vitro*), rendement, morphologie et état prolifératif. Dans un deuxième temps, la sécurité carcinologique des suspensions folliculaires obtenues après isolement a été évaluée par cytométrie en flux multicolore à l'aide d'une modélisation ayant consisté en la contamination de suspensions folliculaires avec des cellules leucémiques issues de patients souffrant de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ou lymphoblastiques (LAL) d'immunophénotype connu. La collagénase NB6 a permis l'isolement d'un grand nombre de follicules vivants, principalement au stade primordial, et dont la majorité était non activée, même après trois jours de culture *in vitro* dans un gel de fibrine. La technique d'isolement suivie de trois lavages a permis d'éliminer les cellules leucémiques préalablement ajoutées aux suspensions folliculaires dans 23 cas sur 24, sans endommager les follicules isolés. La cytométrie en flux multicolore est une technique d'analyse efficace pour évaluer la contamination par des cellules leucémiques, de suspensions contenant des follicules ovariens isolés. Le protocole d'isolement de follicules ovariens humains, ayant été réalisé avec la collagénase NB6 de grade clinique, peut être envisagé pour une reconstruction ovarienne à visée thérapeutique humaine.

Title : Biological qualification of cryopreserved ovarian tissue grafts. Contribution to the codification of re-use techniques in cases of neoplastic disease.

Keywords : Collagenase NB6, good manufacturing practices, isolated ovarian follicles, purification, leukemic cells.

Abstract: The cryopreservation of ovarian cortex is the only technique available for prepubertal girls and women when their pathology requires the administration of a highly gonadotoxic treatment whose initiation cannot be delayed. Autotransplantation has so far been the only available method to re-use cryopreserved ovarian tissue, and has resulted in more than 130 births worldwide, including three at the Besançon Hospital. However, in cases of neoplastic disease with a risk of ovarian metastatic localization, this technique may present a risk of reintroducing malignant cells likely to be present in the graft. Alternative methods to cryopreserved ovarian tissue autograft based on the use of isolated ovarian follicles are currently under development. The aim of this thesis was to develop a protocol allowing the isolation and the qualification of ovarian follicles that can be used in cell therapy for human purposes. In a first step, a validation of the technique to isolate ovarian follicles was carried out from the dissociation of cortical ovarian fragments, taken from patients undergoing a laparoscopic ovarian drilling, using collagenase NB6 which is produced according to good manufacturing practices.

Follicles thus obtained were analyzed in terms of viability (before and after *in vitro* culture), yield, morphology and proliferative state. In a second step, the carcinologic safety of follicular suspensions obtained after isolation was evaluated by multicolor flow cytometry using a model involving the contamination of follicular suspensions with leukemic cells from patients suffering from acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoblastic leukemia (LAL) with known immunophenotype. Collagenase NB6 has allowed the isolation of a large number of viable follicles, mostly at the primordial stage and the majority of which were unactivated even after three days of *in vitro* culture in a fibrin matrice. Our isolation technique followed by three washes has allowed the elimination of leukemic cells previously added to follicular suspensions, in 23 out of 24 cases, without damaging isolated follicles. Multicolor flow cytometry is an effective analytical technique for assessing leukemic cell contamination of suspensions containing isolated ovarian follicles. The protocol to isolate human ovarian follicles, performed with the clinical grade collagenase NB6, may be considered for an ovarian reconstruction to human therapeutic purposes.

Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu les professeurs Catherine Poirot et Florence Brugnon pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

En second lieu, je souhaite remercier mon directeur de thèse, le professeur Christophe Roux et ma co-directrice de thèse, le docteur Clotilde Amiot, pour la confiance qu'ils m'ont témoigné en me donnant l'opportunité de travailler sur ce sujet qui leur tient à cœur. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur eux, en tout temps, durant ces trois années de thèse.

Ensuite, je souhaite remercier les membres de l'équipe de recherche : Tristan Zver, mon voisin de bureau, toujours là pour me conseiller, m'aider et partager les fameux bonbons ! Sophie Frontczak, ma confidente, pour sa grande écoute et son soutien. Jean-Baptiste Prétalli, pour son optimisme à toute épreuve, qui a toujours su trouver les mots pour me remotiver.

Mes remerciements vont également aux personnes suivantes :

- Les techniciennes : Evelyne et sa tendresse, Sophie et sa gentillesse, Geneviève et son enthousiasme, Amélie et son dynamisme, Chantal et son énergie, Christelle et son sourire.
- Joëlle, fan de chat et sa bonne humeur, Martine et son style.
- Les secrétaires : Anne-Marie et sa douceur, Alexia et sa franchise. Merci également à Florence et Fanny, que j'embêtais pour savoir s'il y avait des résections ovariennes de prévu.
- Les biologistes, les docteurs Oxana Blagoskonov et Alphée Bailly pour leurs bonnes humeurs notamment durant les pauses café.
- Le docteur Aurélie Berdin, pour sa gaieté même au bloc opératoire, et surtout pour sa grande contribution à nos recherches. Merci pour les gros fragments !
- Les anciennes stagiaires : Marie, Justine et Ismahène.

Et merci à tout le reste du service de Biologie et Médecine de la Reproduction, Cryobiologie : le docteur Lagré, les sages-femmes et tous ceux que je n'ai pas cité.

De même, un grand merci au professeur Philippe SAAS pour son aide, et tous les membres de l'UMR 1098 notamment Sarah Odrion, Sylvain Perruche et Myriam David.

Et enfin, merci à toutes les nouvelles rencontres que j'ai fait à Besançon : surtout Carline, Emmanuelle, et Yann. Enfin, je remercie mes proches : ma famille, mes amis de Paris, Naye et Michael merci infiniment.

Liste des publications scientifiques:

Mouloungui E, Zver T, Berdin, Roux C, Amiot C. A protocol to isolate and qualify purified human preantral follicles in case of acute leukemia, for future clinical applications. *Journal of Ovarian Research*; 11(1):4, 2018.

Clotilde Amiot, **Elodie Mouloungui**, Tristan Zver, Sophie Frontczak, Aurélie Berdin, Christophe Roux. La réutilisation du tissu ovarien autoconservé : par autogreffe dans le cadre d'un protocole de recherche clinique et par l'utilisation de follicules ovariens isolés. *Morpho*; 10(239):335, 2017.

Zver T, **Mouloungui E**, Berdin A, Roux C, Amiot C. Validation of an automated technique for ovarian cortex dissociation: isolation of viable ovarian cells and their qualification by multicolor flow cytometry. *Journal of Ovarian Research*; 10(1):38, 2017.

Vardar E, Engelhardt EM, Larsson HM, **Mouloungui E**, Pinnagoda K, Hubbell JA, Frey P. Tubular compressed collagen scaffolds for ureteral tissue engineering in a flow bioreactor system. *Tissue Eng Part A*; 21(17-18):2334-45, 2015.

Liste des communications orales:

33rd World annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) – Geneva, Switzerland (3 - 5 Juillet 2017). “Multicolor flow cytometry: a promising tool for ovarian tissue qualification and minimal residual disease detection in human ovarian cortex”.

Zver T, **Mouloungui E**, Berdin A, Roux C, Amiot C.

99^{ème} Congrès de l'Association des Morphologistes et 22e Journées du CHEC - Reims, France (9-11 mars 2017).

“La réutilisation du tissu ovarien cryoconservé par autogreffe (dans le cadre du protocole de recherche clinique PERIDATOR-DATOR, et par utilisation de follicules ovariens isolés”

Amiot C., **Mouloungui E.**, Zver T., Frontczak S., Berdin A., Roux C.

Forum des jeunes chercheurs - Besançon, France (16-17 juin 2016). “Qualification biologique et carcinologique des follicules isolés issus de tissus ovariens humains cryoconservés”

Mouloungui E., Zver T., Berdin A., Roux C., Amiot C.

12^{ème} Journées scientifiques du Groupe de Recherche et d'Etude sur la Cryoconservation de l'Ovaire et du Testicule (Grecot) - Paris, France (2-3 juin 2016). "Biological and carcinologic qualification of isolated follicles from cryopreserved human ovarian tissue"

Mouloungui E., Zver T., Berdin A., Roux C., Amiot C.

4th World congress of the International Society for Fertility Preservation (ISFP) - Shanghai (China) (13 - 15 novembre 2015). "Isolation of viable ovarian cells for ovarian cortex qualification by multicolor flow cytometry"

Zver T., **Mouloungui E.**, Roux C., Amiot C.

Liste des communications affichées:

7^{ème} Editions des fourmis de la recherche – Séminaire de l'UMR 1098 (23 – 24 novembre 2017). "Isolation of human preantral follicles using a good manufacturing practices collagenase NB6: a clinical protocol for ovarien reconstruction".

Mouloungui E., Zver T., Berdin A., Roux C., Amiot C.

33rd World annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) – Geneva, Switzerland (3 - 5 Juillet 2017). "A clinical protocol for isolating human preantral follicles using a good manufacturing practices (GMP) grade collagenase NB6".

Mouloungui E., Zver T., Berdin A., Roux C., Amiot C.

Forum des jeunes chercheurs - Dijon (25 - 26 juin 2015). "Isolation and characterization of human primordial ovarian follicles"

Mouloungui E., Zver T., Roux C., Amiot C.

Sommaire

Résumé.....	2
Liste des tableaux.....	20
Introduction	25
1. Structure et fonctions de l’ovaire	26
1.1. Notions d’anatomie microscopique	26
Région corticale.....	26
Région médullaire.....	26
1.2. Fonctions de l’ovaire.....	27
2. Réserve ovarienne	27
3. Folliculogenèse.....	29
3.1. Description morphologique	29
3.2. Dynamique de la folliculogenèse.....	32
3.2.1. L’initiation ou recrutement	33
Régulation du développement des follicules primordiaux par les hormones, les facteurs de croissances et les cytokines	34
Régulation du développement des follicules primordiaux par les molécules de la voie de signalisation des phosphatidylinositol kinases 3 (PI3Ks).....	35
3.2.2. La croissance basale	37
3.2.3. Le recrutement et la sélection	38
3.2.4. La dominance	38
4. Les effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur la fonction ovarienne	39
4.1. Les impacts de la chimiothérapie sur la fertilité féminine	39
4.2. Les impacts de la radiothérapie sur la fertilité féminine	41

5.	La préservation de la fertilité féminine	44
5.1.	Les indications de préservation de la fertilité féminine	45
5.2.	Les différentes stratégies de préservation de la fertilité féminine (Figure 10)	47
5.2.1.	La cryopréservation d'embryons	47
5.2.2.	La cryopréservation d'ovocytes matures	48
5.2.3.	La cryopréservation de tissu ovarien	50
	La greffe orthotopique	53
	La greffe hétérotopique au niveau de la cavité abdominale	55
	La greffe hétérotopique au niveau du bras ou sus-pubien	55
5.2.4.	La maturation in vitro des complexes cumulo-ovocytaires des follicules antraux.....	58
5.2.5.	La transposition ovarienne.....	60
5.2.6.	La protection hormonale : les analogues de la GnRH	61
5.2.7.	Les agents protecteurs : la protection chimique	64
6.	Le risque de réintroduire des cellules malignes après la greffe de cortex ovarien cryoconservé en cas de leucémies	66
6.1.	Les leucémies.....	66
6.1.1.	Définition.....	66
6.1.2.	Anomalies cytogénétiques et moléculaires associées aux LAM	67
6.1.3.	Anomalies cytogénétiques et moléculaires associées aux LAL	67
6.1.4.	Immunophénotypages associés aux leucémies aigües.....	68
6.2.	Les différentes techniques de détection de la maladie résiduelle	68
6.3.	Le risque de maladie résiduelle.....	73
6.4.	La purification cellulaire en vue d'éliminer les cellules malignes	75
7.	Les techniques alternatives à la greffe de tissu ovarien humain cryoconservé	76
7.1.	La culture in vitro de tissu ovarien.....	76

7.2.	La culture in vitro de follicules ovariens humains isolés.....	80
7.3.	L'activation folliculaire.....	89
7.4.	La construction et l'implantation d'un ovaire artificiel	93
7.5.	L'utilisation de cellules souches	98
	Objectifs.....	102
	Matériels et méthodes	104
1.	Traitement du tissu ovarien.....	105
1.1.	Collecte du tissu ovarien.....	105
1.2.	Congélation/décongélation des fragments de cortex ovarien	105
1.3.	Dissociation des fragments de cortex ovarien	106
1.4.	Décellularisation.....	107
2.	Modèle expérimental d'ajout de cellules leucémiques dans une suspension folliculaire.....	107
2.1.	Congélation/décongélation des cellules leucémiques.....	107
2.2.	Marquages des cellules leucémiques	108
2.3.	Addition des cellules leucémiques dans la suspension folliculaire	108
2.4.	Isolement des follicules primordiaux.....	109
3.	Culture in vitro de follicules ovariens isolés.....	111
3.1.	Formation du gel de fibrine	111
3.2.	Culture in vitro.....	112
4.	Techniques d'analyses et de qualification des follicules isolés	113
4.1.	Classification morphologique des follicules isolés.....	113
4.2.	Calcul du diamètre folliculaire	113
4.3.	Evaluation de la viabilité folliculaire.....	114
4.4.	Cytométrie en flux	115

4.5. Examens histologiques	117
4.6. Immunomarquage	117
4.7. Analyses statistiques	118
Résultats.....	119
1. Evaluation d'une collagénase NB6 de grade GMP, en comparaison à la collagénase IA et à la libérase DH	120
1.1. Rendement	120
1.2. Classification folliculaire.....	120
1.3. Morphologie	121
1.4. Viabilité	123
2. Evaluation des stratégies de réutilisation des follicules isolés.....	127
2.1. Décellularisation de fragments de cortex ovarien cryoconservés.....	127
2.2. Culture in vitro dans un gel de fibrine	128
2.2.1. Concentration et maniabilité du gel de fibrine	128
2.2.2. Dégradation du gel de fibrine	129
2.2.3. Viabilité	130
2.2.4. Diamètre des follicules avant et après 3 jours de culture in vitro.....	131
2.2.5. Etude de l'état prolifératif des follicules isolés avant et après culture in vitro.....	132
3. Purification de cellules leucémiques au sein d'une suspension folliculaire	134
3.1. Analyse morphologique.....	134
3.2. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicoloreurs	135
3.3. Viabilité	140
Discussion.....	142
Conclusion et perspectives	156
Bibliographie	160

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Coupe histologique d'un ovaire de chat après coloration au Trichrome de Masson. 1. Cortex; 2. Médullaire; 3. Epithélium germinatif; 4. Couches de follicules primordiaux; 5. Follicule primaire; 6. Follicule secondaire; 7. Follicule antral; 8. Corp jaune; barre d'échelle : 100 μm (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon). 27
- Figure 2. Estimation de la population de cellules germinales dans l'ovaire d'un fœtus humain (tiré d'une analyse de Baker (1963) et Forabosco et Sforza (2007) (Kerr et coll., 2013)). 28
- Figure 3. Coupe histologique de follicules ovariens de chat à différents stade de croissance, après coloration au trichrome de Masson : (A) follicules primordiaux; (B) follicule primaire; (C) follicule secondaire ; (D) follicule antral ; barre d'échelle = 100 μm (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon). 30
- Figure 4. Schéma représentant les quatre phases de la folliculogenèse chez l'Homme, décrivant la durée de chaque phases, la taille des follicules et la sensibilité des cellules de la granulosa aux hormones gonadotropes. GCs : granulosa cells (Gougeon, 2010). 32
- Figure 5. Schéma récapitulatif des différents éléments pouvant être impliqués dans l'activation des follicules primordiaux (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon). 33
- Figure 6. Evolution des taux plasmatiques d'AMH au cours de la vie d'une femme (Visser, 2006). 34
- Figure 7. Schématisation de la régulation de la réserve ovarienne par la voie de signalisation des PI3Ks (Zheng et coll., 2012). 36
- Figure 8. Illustration des principaux éléments de la voie de signalisation des PI3Ks. Les signes « - » correspondent aux signaux d'inhibition et les signes « + » aux signaux d'activation (Modifiée à partir de Zheng et coll. (318)). 37
- Figure 9. Le modèle Faddy-Gosden (Wallace et coll., 2003). 43
- Figure 10. Schéma représentant les différentes stratégies de préservation de la fertilité pour les patientes atteintes d'un cancer (Modifié à partir d'Anderson et coll. (14) et Chian et coll. (52)). 47
- Figure 11. Photos montrant la technique de découpe de l'ovaire après ovariectomie. A. Ovaire coupé transversalement, avant retrait de la médullaire ; B. Ovaire coupé transversalement,

après retrait de la médullaire ; C. Fragments de cortex ovariens avant la congélation (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon).	52
Figure 12. Série des 86 naissances publiées et obtenues après autogreffe de cortex ovarien cryopréservé au monde. CL = congélation lente ; V = vitrification ; ^a = jumeaux ; ND = données non disponibles ; CN = conception naturelle (D'après Jensen et coll. (150) et Donnez and Dolmans (88))......	54
Figure 13. Photo montrant la technique d'aspiration des follicules antraux au niveau cortical de l'ovaire (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon).	58
Figure 14. Photo d'un ovocyte immature après aspiration (à gauche) ; photo d'un ovocyte mature après 24 heures de maturation in vitro (au centre) ; photo d'ovocytes après décoronisation suite à la maturation in vitro durant 24 heures (à droite) (Walls et coll., 2015).	59
Figure 15. Vue cœlioscopique de la cavité pelvienne : A gauche, avant la transposition; A droite, l'ovaire gauche transposé par suture non-résorbable à la paroi de la cavité abdominale (D'après Irtan et coll. (146))......	60
Figure 16. Schéma représentant un potentiel mécanisme d'action des analogues de la GnRH, via l'inhibition de l'œstradiol (E2) et de l'inhibine, ayant pour effet une diminution de la concentration en FSH et donc une diminution de l'atrésie des follicules primordiaux provoquée par la chimiothérapie (Blumenfeld, 2007)......	62
Figure 17. Variation du compte de follicules primordiaux au sein d'un ovaire de souris après 1 semaine de traitement avec des doses variables de cyclophosphamide, avec (en rouge) ou sans co-traitement à l'AS101 (en bleu) (Kalich-Philosoph et coll., 2013).	64
Figure 18. Schéma représentant l'effet d'AS101 sur la voie PI3K/PTEN/Akt lors du traitement d'un ovaire par le cyclophosphamide (Kalich-Philosoph et coll., 2013)......	65
Figure 19. Pourcentage de follicules au sein d'un tissu ovarien humain exprimant la caspase 3 activée (AC3, un marqueur de l'activation de l'apoptose), après traitement au cyclophosphamide (Cy) avec ou sans sphingosine-1-phosphate (S1P), par rapport au contrôle (Li et coll., 2014)......	66
Figure 20. Coupe histologique de tissu ovarien après xélogreffe, sur laquelle un envahissement par des cellules malignes autour d'un follicule secondaire est clairement visible, après coloration à l'hématoxyline éosine (Dolmans et coll., 2010).	69

Figure 21. Vue macroscopique de la procédure de xénogreffe de tissu ovarien humain, au niveau de la cavité péritonéale, sur une souris immunodéficientes (Dolmans et coll., 2010).	70
Figure 22. Corrélation entre le niveau de maladie résiduelle mesuré (en pourcentage) par RTq-PCR et par CFM (Amiot et coll., 2013).....	72
Figure 23. Photos d'un fragment de tissu ovarien contenant des follicules ovariens humains colorés au rouge neutre après 7 jours de culture in vitro. Barre d'échelle = 50 µm (Khosravi et coll., 2013).....	78
Figure 24. Photo d'un « cluster » de follicules issus de la dissociation partielle de tissu ovarien humain. Les flèches indiquent les follicules présents au sein du « cluster » ; barre d'échelle = 240 µm (Hovatta et coll., 1999).	79
Figure 25. Follicules isolés obtenus à partir de la dissociation enzymatique et mécanique de tissu ovarien humains (D'après Chiti et coll. (54)).	81
Figure 26. Photo d'un follicule secondaire de souris isolé mis en culture dans une boîte de pétri (à gauche) ; Photo d'un follicule secondaire de souris isolé après 2 jours de culture, où l'on peut observer des adhérences au niveau des cellules de la thèque ainsi que des cellules stromales en prolifération (à droite) (Smitz and Cortvrindt, 2002).....	84
Figure 27. Follicules primordiaux de macaques après 3 jours de culture dans un gel d'alginate à 0,2 % ; un follicule primordial obtenu après dissociation enzymatique est encadré (Tiré de l'article de Hornick et coll. (140))......	85
Figure 28. Photos représentant des follicules encapsulés dans une matrice mixte fibrine-alginate (FA), où l'on peut observer le processus de dégradation de la fibrine caractérisé par un anneau clair autour des follicules en développement. Observation de l'anneau de dégradation de la fibrine dans un champ lumineux à 0 (a), 2 (b), 4 (c) et 6 (d) jours de culture in vitro. Coupe cytologique de matrices FA montrant l'anneau de dégradation de la fibrine après 2 (e) et 3 (f) jours de culture, et un follicule en croissance (g,h). Barre d'échelle = 100 µm; (Shikanov et coll., 2011).....	86
Figure 29. Schéma représentant la culture multi-étapes décrites par Telfer et coll., 2008 (Telfer et coll., 2008); Première étape : Culture in vitro de fragments de cortex ovarien préalablement découpés dans un milieu permettant l'activation folliculaire ; Deuxième étape : Isolement des follicules de grande taille et culture in vitro 3D jusqu'au stade antral ; Troisième étape : Maturation ovocytaire et transfert d'embryons congelés (Schéma modifié à partir de Kim et coll. (160))......	88
Figure 30. Schéma représentant les gènes impliqués dans la fragmentation de tissus ovariens, la voie de signalisation Hippo et la croissance folliculaire : la polymérisation d'actine-F induit	

une augmentation du gène YAP au niveau du noyau de l'ovocyte, ce qui induit une augmentation de l'expression du facteur de croissance CCN et de BIRC, un inhibiteur de l'apoptose (Kawamura et coll., 2013).	91
Figure 31. Schéma comparatif entre la transplantation de tissu ovarien cryoconservé et la greffe de fragments de tissu ovarien après traitement consistant en l'activation folliculaire in vitro (Schéma modifié à partir de Kawamura et coll. (153)).	92
Figure 32. Coupe histologique d'un ovaire artificiel à base d'alginate après une semaine de greffe, par coloration à l'hématoxyline-éosine. A gauche un follicule antral de souris au sein d'une bille d'alginate, à droite des cellules ovariennes de souris au sein d'une bille d'alginate. Barre d'échelle = 100 µm (Tirée de Vanacker et coll. (296)).	94
Figure 33. Photo d'un ovaire bovin entier décellularisé au 0,1 % SDS durant 28 jours (Laronda et coll., 2015).	96
Figure 34. Photos d'un fragment de tissu ovarien bovin décellularisé greffé sous la capsule rénale d'une souris ovariectomisée, avec (a) ou sans (b) cellules ovariennes de souris ; Barre d'échelle = 1mm ; (c). Coupe histologique sagittale du greffon avec deux follicules visibles (encadré bleu) après coloration à l'hématoxyline-éosine; Barre d'échelle = 100 µm (Laronda et coll., 2015).	97
Figure 35. Photos de larges structures de type folliculaire obtenues à partir de la culture de cellules souches ovariennes humaines après 21 jours de culture in vitro, par coloration à l'hématoxyline-éosine. Barre d'échelle = 20 µm (Parte et coll., 2014).	98
Figure 36. Schéma représentant les différentes alternatives de préservation de la fertilité féminine basées sur l'utilisation de cellules souches (Schéma modifié à partir de Kim et coll. (160)).	99
Figure 37. Coupe histologique de « follicle-like cells » obtenues à partir d'hESCs xéno greffées dans un rein de souris. La double flèche montre la vésicule germinale observée au centre de la structure (D'après Jung et coll. (151)).	100
Figure 38. Coupe histologique d'un fragment d'ovaire issu de souris en insuffisance ovarienne précoce après xéno greffe de cellules de structure similaires aux cellules ovariennes issues d'iPSCs, après coloration à l'hématoxyline et éosine (Tiré de Liu et coll. (182)).	101
Figure 39. Addition de cellules leucémiques, par dilutions successives, au sein de suspensions folliculaires.	109
Figure 40. Schéma représentant les étapes utilisées pour l'isolement de follicules primordiaux.	110

Figure 41. Schéma représentant les éléments sélectionnés pour être analysés par cytométrie en flux.	111
Figure 42. Diamètre des follicules isolés avec respectivement la collagénase NB6 de grade GMP, la collagénase IA et la libérase DH (μm); Chaque point ou carré représente un follicule analysé; *** = différence statistiquement significative.	122
Figure 43. Photos de la classification des follicules isolés en fonction du nombre des cellules de la granulosa mortes. Follicules vivants dit V1 après coloration au bleu Trypan (A) et après test de viabilité Calcéine AM/Ethidium homodimère-1(D). Follicules peu endommagés dit V2 après coloration au bleu Trypan (B) et après test de viabilité Calcéine AM/Ethidium homodimère-1(E). Follicules morts dit V4 après coloration au bleu Trypan (C) et après test de viabilité Calcéine AM/Ethidium homodimère-1(F). Barre d'échelle = 40 μm	123
Figure 44. Photos de suspensions folliculaires sous un microscope inversé. A. Suspension folliculaire obtenue après dissociation de fragments de cortex ovarien cryoconservés avec une collagénase IA. B. Suspension folliculaire obtenue après dissociation de fragments de cortex ovarien cryoconservés avec une collagénase NB6 de grade GMP. Barre d'échelle = 50 μm	125
Figure 45. Photos montrant la viabilité des follicules isolés après dissociation avec la collagénase NB6 de grade GMP (Figure A-D), la libérase DH (Figure B-E) et la collagénase IA (Figure C-F). Les cellules mortes ou endommagées émettent une fluorescence rouge (éthidium homodimère-1), tandis que les cellules vivantes émettent une fluorescence verte (calcéine AM). Barre d'échelle = 100 μm	126
Figure 46. Coupes histologiques de fragments de cortex ovarien cryoconservés. Fragment de cortex ovarien non décellularisé après coloration au trichrome de Masson (A) et après coloration nucléaire au DAPI (C) (contrôle positif). Fragment de cortex ovarien décellularisé après coloration au trichrome de Masson (B) et après coloration nucléaire au DAPI (D).....	127
Figure 47. Photos d'un gel de fibrine de concentrations F12,5/T1(A) et de concentration F50/T10 (B).....	128
Figure 48. Photos de follicules isolésensemencés dans un gel de fibrine F50/T10 après polymérisation (J0). Follicules primordial (A), primaire (B) et secondaire (C) dans du milieu de culture observés sous un champ lumineux. Follicules primordial (D), primaire (E) et secondaire (F) observés après coloration à l'hématoxyline-éosine.....	129
Figure 49. Photos de follicules isolésensemencés dans un gel de fibrine F50/T10 après 3 jours de culture in vitro (J3). A. Follicule au sein d'un gel immergé dans du milieu de culture	

observés sous un champ lumineux. B. Coupe d'un follicule au sein d'un gel après coloration à l'hématoxyline-éosine. Les flèches montrent les follicules. Barre d'échelle = 100 μm 130

Figure 50. Diamètre des follicules dans un gel de fibrine avant (J0) et après trois jours (J3) de culture *in vitro* (μm). Chaque point représente un follicule analysé. * = différence statistiquement significative. 132

Figure 51. Coupe après analyse immunocytochimique de follicules isolés ensemencés dans un gel de fibrine F50/T10. A. Follicule primordial Ki67-négatif (cellules colorées en bleu). B. Follicule secondaire Ki67-négatif (cellules colorées en bleu). C. Follicule primaire avec une cellule Ki67-positif (cellule colorée en marron). D. Follicule secondaire avec deux cellules Ki67-positives (cellules colorées en marron). 133

Figure 52. Photos de suspensions cellulaires sous un microscope inversé; A. Cellules leucémiques (contrôle positif). B. Suspension ovarienne contenant des follicules après ajout de cellules leucémiques (sans lavages). C. Suspension ovarienne contenant des follicules isolés après trois lavages. 134

Figure 53. Photos de suspensions cellulaires sous un microscope inversé. A. Cellules leucémiques (contrôle positif). B. La même suspension contenant des cellules leucémiques marquées (fluorescence verte). C. Suspension ovarienne contenant des follicules isolés après trois lavages. D. La même suspension ovarienne contenant des follicules isolés après trois lavages. Les flèches montrent les deux cellules leucémiques marquées, retrouvées après trois lavages. 135

Figure 54. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicouleurs (CFM) dans des suspensions ovariennes contenant des follicules isolés après ajout de 10^6 cellules leucémiques. Seules les cellules nucléées vivantes (SYTO13⁺/7AAD⁻) CD45_{low} ont été représentées (points violets). Les points noirs représentent les cellules leucémiques détectées par leur immunophénotype caractéristique : CD38⁺/CD43⁺/CD361⁺/CD117⁺ parmi les CD45_{low}. Un événement positif doit être à l'intersection des populations P1 (CD38 versus CD43), P2 (CD43 versus CD361) et P3 (CD38 versus CD117). A. Contrôle positif (cellules leucémiques). B. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contenant des follicules isolés après ajout de 10^6 cellules leucémiques (n = 2069 événements détectés). C. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contaminée par 10^6 cellules leucémiques après trois lavages (n = 7 événements détectés). 138

Figure 55. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicouleurs (CFM) dans des suspensions ovarienne contenant des follicules isolés après ajout de 10^5 cellules leucémiques. Seuls les cellules nucléées vivantes SYTO13⁺/7AAD⁻ qui sont CD45_{low} ont été représentées (points violets); Les points noirs représentent les cellules leucémiques détectées par leur immunophénotype caractéristique : CD38⁺/CD43⁺/CD361⁺/CD117⁺ parmi

les CD45_{low}. Un évènement positif doit être à l'intersection des populations P1 (CD38 versus CD43), P2 (CD43 versus CD361) et P3 (CD38 versus CD117); A. Contrôle positif (cellules leucémiques); B. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contenant des follicules isolés après ajout de 10⁵ cellules leucémiques (n = 2069 évènements détectés); C. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contaminée par 10⁵ cellules leucémiques après trois lavages (n = 7 évènements détectés)..... 139

Figure 56. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicolours (CFM) dans des suspensions ovarienne contenant des follicules isolés après ajout de 10⁴ cellules leucémiques. Seuls les cellules nucléées vivantes SYTO13⁺/7AAD⁻ qui sont CD45_{low} ont été représentées (points violets); Les points noirs représentent les cellules leucémiques détectées par leur immunophénotype caractéristique : CD38⁺/CD43⁺/CD361⁺/CD117⁺ parmi les CD45_{low}. Un évènement positif doit être à l'intersection des populations P1 (CD38 versus CD43), P2 (CD43 versus CD361) et P3 (CD38 versus CD117); A. Contrôle positif (cellules leucémiques); B. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contenant des follicules isolés après ajout de 10⁴ cellules leucémiques (n = 2069 évènements détectés); C. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contaminée par 10⁴ cellules leucémiques après trois lavages (n = 7 évènements détectés)..... 140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Tableau représentant le niveau de risque de dommages sur la fonction ovarienne en fonction de l'agent chimiothérapeutique utilisé (Tiré de l'article d'Angarita et coll. (15)).	41
Tableau 2. Tableau représentant les doses limites (en Gray) estimées à partir desquelles une altération de la folliculogénèse est constatée, en fonction de l'âge (Tiré de l'article d'Irtan et coll. (146); d'après les données de Wallace et coll. (303)).	42
Tableau 3. Les pathologies relevant d'une indication pour la préservation de la fertilité féminine (haut) et la gravité du risque d'atteinte de la fonction ovarienne associées (bas) (D'après Donnez and Dolmans (87)).	46
Tableau 4. Tableau représentant les différentes études effectuées dont les résultats sont en faveur ou non de la co-administration d'analogues de la GnRH lors de la chimiothérapie, et le nombre de patientes incluses dans l'étude (D'après Blumenfeld and Evron (34)).	63
Tableau 5. Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des différentes enzymes disponibles pour la dissociation de follicules ovariens isolés humains; NC : non connu (d'après les données des fournisseurs).	83
Tableau 6. Classification des follicules en fonction du stade pour chaque protocole de dissociation enzymatique de fragments de tissu ovarien cryoconservés.	121
Tableau 7. Viabilité des follicules isolés, de V1 à V4, en fonction du nombre de cellules de la granulosa endommagées, après dissociation de fragments de tissu ovarien cryoconservés avec une collagénase IA (n = 7 fragments de patientes), une collagénase NB6 de grade GMP (n = 6 fragments de patientes), et une libérase DH (n = 5 fragments de patientes).	124
Tableau 8. Viabilité des follicules isolés, de V1 à V4, en fonction du nombre de cellules de la granulosa endommagées, après 3 jours de culture in vitro (n = 9 gels de fibrine).	131
Tableau 9. Résultats obtenus par CFM à partir de l'analyse de 24 suspensions ovariennes suite à l'ajout de 10^3 à 10^6 cellules leucémiques, avant et après trois lavages. LAL-B = leucémie aigüe lymphoblastique de type B; LAM = leucémie aigüe myéloblastique. La seule suspension ovarienne considérée comme positive après trois lavages a été encadrée en rouge.	136
Tableau 10. Viabilité des follicules isolés, de V1 à V4, en fonction du nombre de cellules de la granulosa endommagées, après 3 lavages.	141

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Akt : *Protein Kinase B*

AMH : *Anti-Müllerian Hormone*

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments

APC : Allophycocyanine

AS101 : Ammonium trichloro (dioxo éthylène-0,0') téllurate

BCR-ABL : Assemblage d'un gène du chromosome 9 avec un gène du chromosome 22.

BIS : *Bispecific Antibody*

BMP : *Bone Morphogenetic Protein*

BPF : Bonne Pratique de Fabrication

CBF : *Core Binding Factor*

CCO : Complexe Cumulo-Ovocytaire

CD : Cluster de Différenciation

CEBPA : *CCAAT-Enhancer Binding Protein A*

CFM : Cytométrie en Flux Multicouleurs

CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire

CRLF : *Cytokine Receptor-Like Factor*

CTO : Cryopréservation de Tissu Ovarien

Cy : Cyclophosphamide

DH : *High Dispase*

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

EFS : Etablissement Français du Sang

EGF : *Endothelial Growth Factor*

ESCs : *Embryonic Stem Cells*

F : Fibrine

FA : Fibrine-Alginate

FACS : *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FC : Fibrine-Collagène

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

FIV : Fécondation *In Vitro*

FLT3: *Fms-Like Tyrosine kinase 3*

FOXO : *Forkhead box protein O3*

FSH : *Follicle-Stimulating Hormone*

GDF : *Growth Differentiation Factor*

GMP : *Good Manufacturing Practices*

GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone*

Gy : Gray

hCG : hormone Chorionique Gonadotrope

ICSI : *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*

Ig : Immunoglobuline

IGF : *Insulin Growth Factor*

IOP: Insuffisance Ovarienne Précoce

iPSCs : *induced Pluripotent Stem Cells*

ITS : Insuline, Transferrine, Sodium-Sélénite

JAK : *Janus Kinase*

LAIP : *Leukemia-Associated Immunophenotype*

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigüe Myéloblastique

LH : *Luteinizing Hormone*

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MEM : *Eagle's Minimal Essential Medium*

MIV : *Maturation In Vitro*

MLL : *Mixed Lineage Leukemia*

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

NMP1 : *Nucleophosmin-1*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OSCs : *Ovarian Stem Cells*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*

PE : *Phycoérythrine*

Ph : *Philadelphia*

PI3K : *Phosphatidylinositol Kinase 3*

PIP : *Phosphatidylinositol Phosphate*

PTEN : *Phosphatase and Tensin homolog*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT-qPCR : *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction*

S1P : *Sphingosine-1-Phosphate*

SCF : *Stem Cell Factor*

SDS : Sodium Dodécane Sulfate

SLM : *Sterile Lyophilized high Mannuronate*

SOPK : Syndrome des Ovaires Polykystiques

STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T : Thrombine

TCR : *T-Cell Receptor*

TGF : *Transforming Growth Factor*

TM : *Thermolysin*

TSC : *Tuberous Sclerosis Complex*

V : Viabilité

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

INTRODUCTION

1. Structure et fonctions de l'ovaire

1.1. Notions d'anatomie microscopique

Dans l'espèce humaine, la femme possède deux ovaires droit et gauche, situés dans la cavité pelvienne. Ils mesurent environ 4 cm de long et 2 cm de large, et sont divisés en deux régions : la région corticale et la région médullaire.

Région corticale

La surface de l'ovaire est limitée par un épithélium dit germinatif, sous lequel on trouve le stroma qui constitue une dense couche de tissu conjonctif appelée albuginée. Sous l'albuginée, le cortex correspond à la partie qui contient les follicules ovariens à différents stades de leur croissance, répartis de manière aléatoire parmi les cellules conjonctives.

La distribution folliculaire au sein du cortex est très hétérogène, pouvant varier du simple au double dans différentes régions du même ovaire et entre les deux ovaires d'une même femme (Schmidt *et coll.*, 2003). Toutefois, les follicules primordiaux, qui constituent la réserve ovarienne, sont localisés au niveau de la surface corticale, à 1-2 mm d'épaisseur (Silber, 2016).

Région médullaire

Située dans la partie la plus interne de l'ovaire, cette région est constituée principalement de tissu conjonctif plus lâche, et renferme de nombreux vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques ainsi que des nerfs (Oktem and Oktay, 2008) (Figure 1). Lors de leur croissance, les follicules ovariens vont progresser de manière dynamique de la corticale vers la médullaire.

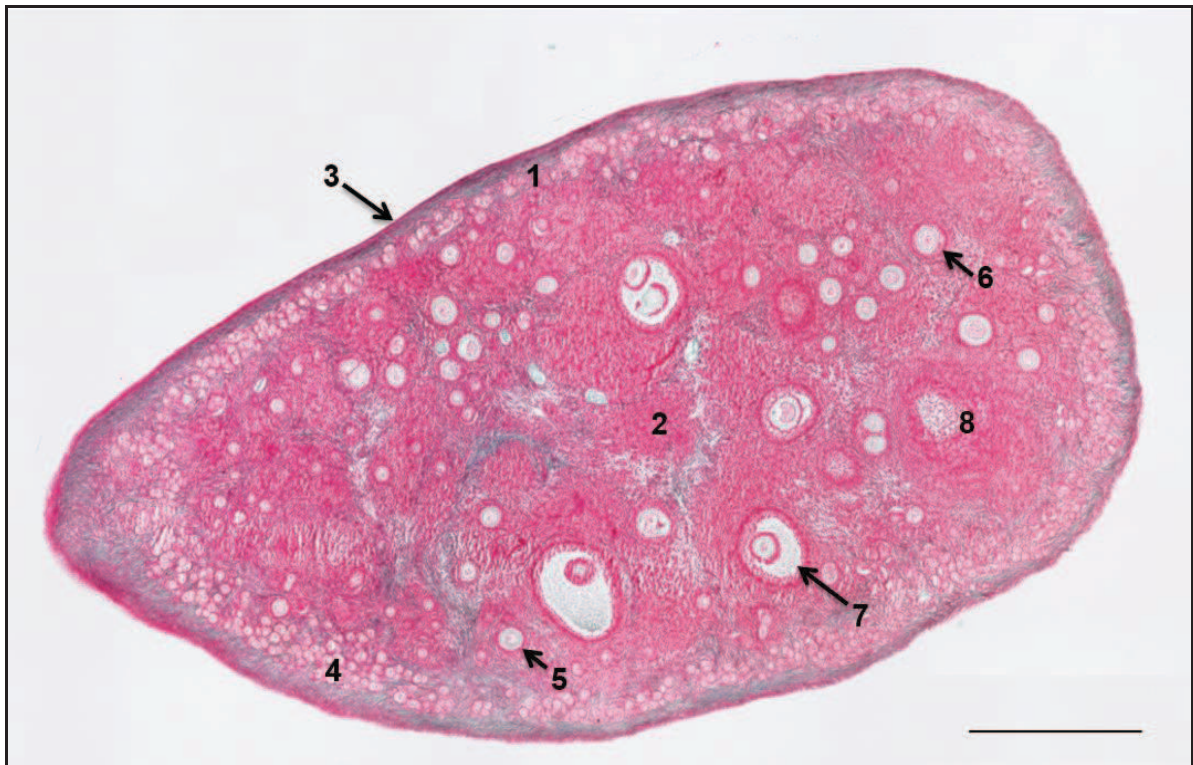


Figure 1. Coupe histologique d'un ovaire de chat après coloration au Trichrome de Masson. 1. Cortex; 2. Médullaire; 3. Epithélium germinatif; 4. Couches de follicules primordiaux; 5. Follicule primaire; 6. Follicule secondaire; 7. Follicule antral; 8. Corp jaune; barre d'échelle : 100 μ m (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon).

1.2. Fonctions de l'ovaire

L'ovaire a deux fonctions essentielles : la maturation d'un ovocyte compétent et prêt à être fécondé (fonction exocrine), ainsi que la sécrétion d'hormones stéroïdes sexuelles requises pour la folliculogenèse et l'ovulation qui vont permettre la fécondation, l'établissement de la grossesse (fonction endocrine) et également agir sur les organes cibles tels que l'utérus.

2. Réserve ovarienne

Les follicules primordiaux constituent la réserve ovarienne. La dynamique de cette réserve est déterminée par le nombre de follicules primordiaux formés, et elle est sous contrôles génétiques et moléculaires (Pelosi *et coll.*, 2015).

La folliculogénèse commence dès le stade fœtal, et continuera jusqu'à ce que la réserve ovarienne soit épuisée durant la ménopause.

Chez l'Homme, les follicules sont produits à partir de cellules germinales primordiales localisées au niveau des gonades en développement. En effet, les cellules germinales primordiales apparaissent pour la première fois entre la 3^{ème} et 5^{ème} semaine de grossesse au niveau du diverticule allantoïdien le long du mésentère dorsal (Hirshfield, 1991). Durant la 7^{ème} semaine, les cellules germinales primordiales vont coloniser le tissu gonadique et seront appelées ovogonies. Leur nombre va augmenter considérablement du fait de plusieurs divisions mitotiques, passant de 10000 à 600000 à la 8^{ème} semaine, pour atteindre 6×10^6 à la 20^{ème} semaine de grossesse (Oktem and Urman, 2010) (Figure 2).

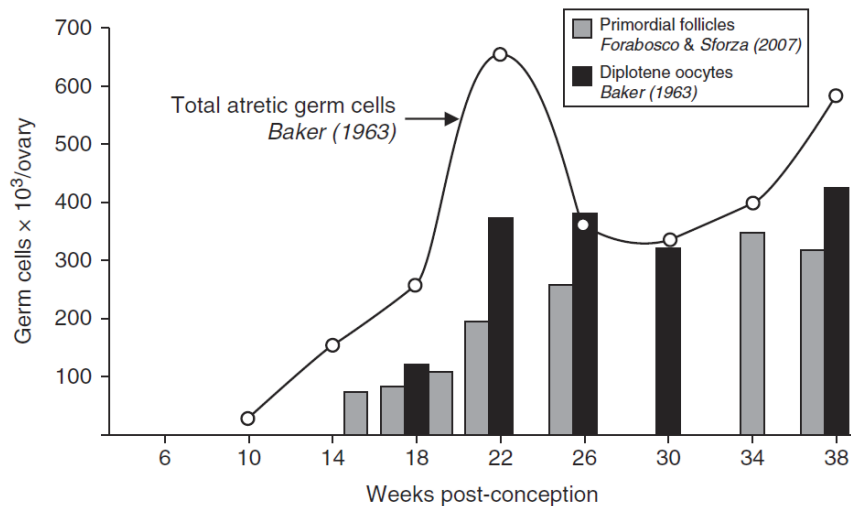


Figure 2. Estimation de la population de cellules germinales dans l'ovaire d'un fœtus humain (tiré d'une analyse de Baker (1963) et Forabosco et Sforza (2007) (Kerr *et coll.*, 2013)).

Les mitoses vont ensuite cesser, et la méiose va commencer. A cet instant, les ovogonies vont devenir des ovocytes, qui vont progresser dans la méiose jusqu'à finalement s'arrêter au stade diplotène de prophase I (Borum, 1961). Les premiers follicules primordiaux apparaissent à la 15^{ème} semaine de grossesse.

Du 6^{ème} au 9^{ème} mois de grossesse, certains ovocytes vont dégénérer par apoptose, tandis que les ovocytes restant vont s'entourer d'une couche de cellules somatiques pour former les follicules primordiaux (Grive and Freiman, 2015; Hannon and Flaws, 2015).

Certains de ces follicules primordiaux vont entrer en croissance avant la naissance et par la suite mourir par apoptose. A la naissance le stock de follicules primordiaux est de ce fait estimé à environ 1×10^6 , cependant ce stock va diminuer progressivement jusqu'à environ 400000 à la puberté. Chez les femmes en âge de procréer, 99 % des follicules vont subir une atrophie. Cela signifie que seuls environ 400 follicules vont atteindre le stade ovulatoire chez une femme (Baker, 1971).

3. Folliculogenèse

3.1. Description morphologique

La folliculogenèse a deux fonctions principales : la libération d'un complexe cumulo-ovocytaire nécessaire à la fécondation, et la formation d'un corps jaune qui induit la production de progestérone et d'œstradiol permettant de maintenir la grossesse (Oktem and Urman, 2010).

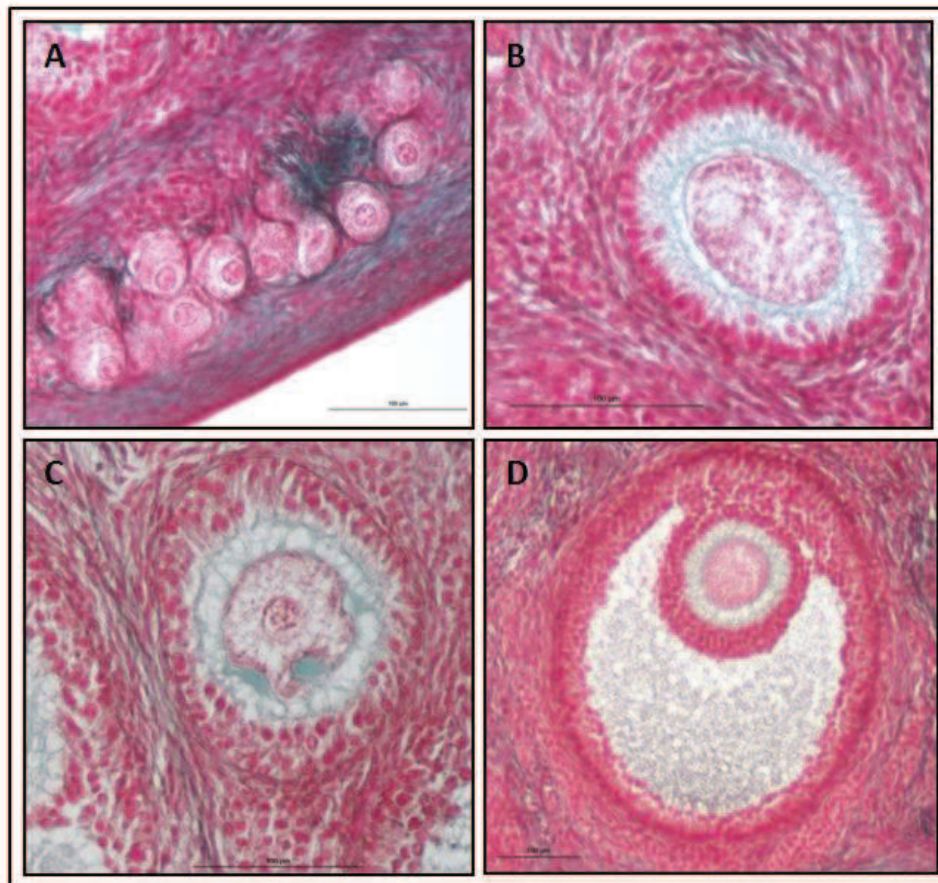


Figure 3. Coupe histologique de follicules ovariens de chat à différents stade de croissance, après coloration au trichrome de Masson : (A) follicules primordiaux; (B) follicule primaire; (C) follicule secondaire ; (D) follicule antral ; barre d'échelle = 100 µm (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon).

Les follicules primordiaux, d'un diamètre moyen de 35 µm, contiennent un ovocyte d'environ 30 µm bloqué au stade diplotène de la prophase de la première division méiotique. L'ovocyte est composé d'un volumineux noyau central, et il est entouré d'une couche de cellules folliculeuses de forme aplatie (cellules de la pré-granulosa).

Le recrutement des follicules primordiaux quiescents puis leur activation commence durant la vie foetale, et continuera jusqu'à ce que le stock de la réserve ovarienne soit épuisé durant la ménopause. L'activation folliculaire va induire un changement morphologique et les cellules folliculeuses vont devenir cubiques. Le follicule dit primaire possède un diamètre pouvant aller de 40 à 60 µm, et l'ovocyte sera délimité par une couche de glycoprotéines appelée zone pellucide.

Les cellules de la granulosa vont subir une expansion mitotique et seront positionnées en multicouches (3 à 4 couches en moyenne en début de croissance), autour de l'ovocyte dont le diamètre va également croître pouvant aller de 60 à 80 μm . Les cellules de la granulosa seront entourées par une fine membrane appelée la membrane de Slavjanski. Ce stade dit pré-antral (avant la formation de l'antrum) est aussi caractérisé par la formation d'une thèque interne en périphérie du follicule. Le follicule est alors appelé follicule secondaire, et son diamètre est de 60 à 180 μm .

Les follicules vont subir une période de croissance durant laquelle leur diamètre va passer de 0,2 à 10 mm. Les follicules seront caractérisés par la présence d'une cavité centrale, appelée antrum située au niveau des cellules de la granulosa dont la taille et le nombre va encore augmenter. La croissance folliculaire observée, jusqu'au stade pré-ovulatoire, s'effectue essentiellement par l'accroissement du volume de l'antrum. A ce stade, la vascularisation sera plus importante, et une couche de cellules fibroblastiques va se différencier en cellules théquales pour former la thèque externe qui va délimiter la périphérie du follicule. La formation de l'antrum folliculaire indique le début du stade antral et donc le développement du follicule antral (Gougeon, 1986; Oktem and Urman, 2010).

Le follicule antral, ayant atteint 20 mm et composé d'un ovocyte entouré d'une zone pellucide d'environ 120 μm de diamètre, sera le plus mature dans l'ovaire humain. Chaque cycle menstruel nécessite la présence d'un follicule antral, dont le recrutement, cyclique, est gonadotrophines-dépendant (Hannon and Flaws, 2015) (Figure 3).

La maturation folliculaire est cyclique et gonadotrophines-dépendant. En effet, elle est sous l'influence de l'hormone lutéinisante (« Luteinizing Hormone », LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (« Follicle-Stimulating Hormone », FSH). La sécrétion de ces hormones est due à la libération de l'hormone GnRH (« Gonadotropin Releasing Hormone ») au niveau de l'hypothalamus (Hawkins and Matzuk, 2008).

Cette maturation est caractérisée par la reprise de la méiose au sein de l'ovocyte, on parle donc de maturité méiotique. La première division de méiose va s'achever et la deuxième division va s'effectuer jusqu'à son arrêt au stade métaphase 2. A cet instant, le follicule sera dit ovulatoire, ou follicule de De Graaf.

L'ovulation a lieu au 14^{ème} jour du cycle menstruel (pour un cycle de 28 jours), et correspond à l'expulsion de l'ovocyte bloqué au stade diplotène de prophase I, sous l'action d'œstradiol, due à un pic de LH. La structure restante du follicule va se transformer en corps jaune.

L'ovocyte sera activé lors de la fécondation par le spermatozoïde et finira alors sa méiose. S'il n'y a pas de fécondation, l'ovocyte dégénérera. A la fin du cycle ovarien, les activités de synthèse diminuent et le corps jaune va se résorber pour ne laisser qu'une trace cicatricielle ou *corpus albicans* (Hawkins and Matzuk, 2008).

Dans l'espèce humaine, il faudra environ trois mois pour qu'un follicule pré-antral atteigne la taille ovulatoire.

3.2. Dynamique de la folliculogénèse

La folliculogénèse peut être divisée en quatre phases : l'initiation de la croissance folliculaire ou recrutement, la croissance basale, la sélection et la dominance (Figure 4).

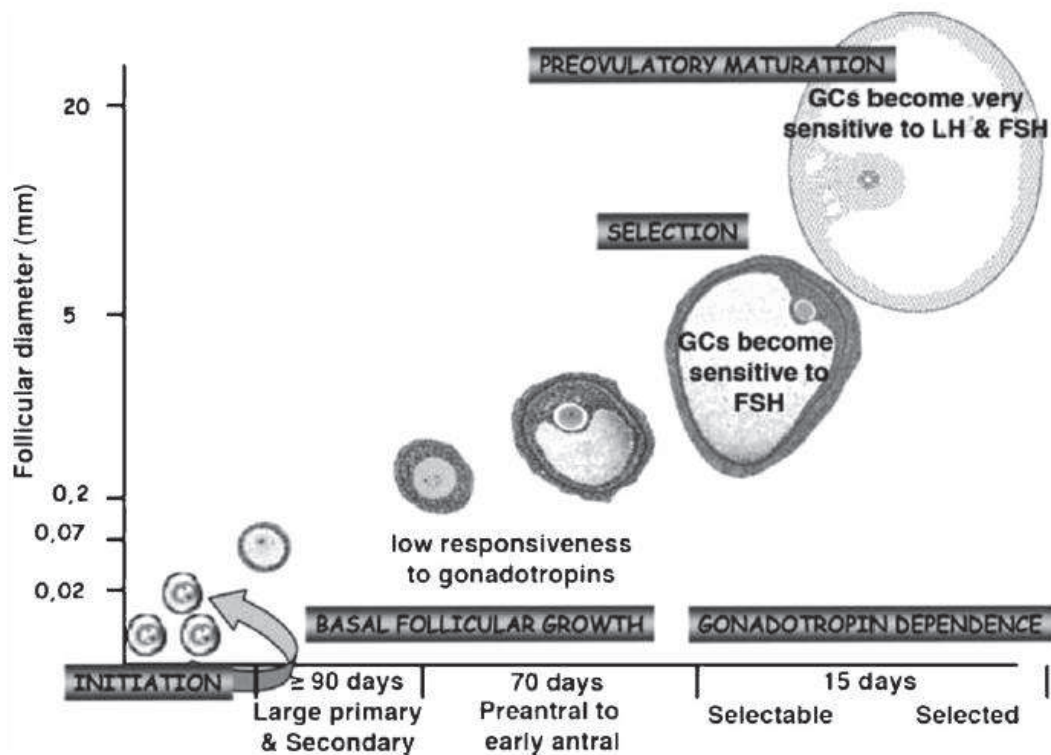


Figure 4. Schéma représentant les quatre phases de la folliculogénèse chez l'Homme, décrivant la durée de chaque phases, la taille des follicules et la sensibilité des cellules de la granulosa aux hormones gonadotropes. GCs : *granulosa cells* (Gougeon, 2010).

3.2.1. L'initiation ou recrutement

L'initiation de la croissance folliculaire est contrôlée par de nombreux facteurs d'origine ovocytaire et somatique agissant essentiellement selon un mode paracrine et autocrine.

En effet, une fois la population de follicules primordiaux formée, trois destins différents sont possibles :

- soit ils vont rester quiescents afin de constituer la réserve ovarienne,
- soit ils vont dégénérer par mort programmée appelée apoptose,
- ou alors ils vont s'activer pour devenir des follicules primaires par un processus appelé recrutement folliculaire (McGee and Hsueh, 2000).

Le recrutement folliculaire est gonadotrophines-indépendant, il est régulé par des facteurs de croissance en relation avec différentes voies de signalisation. La perturbation de ces voies de signalisation due à des changements environnementaux ou génétiques peut avoir des conséquences irréversibles sur la reproduction (Grive and Freiman, 2015) (Figure 5).

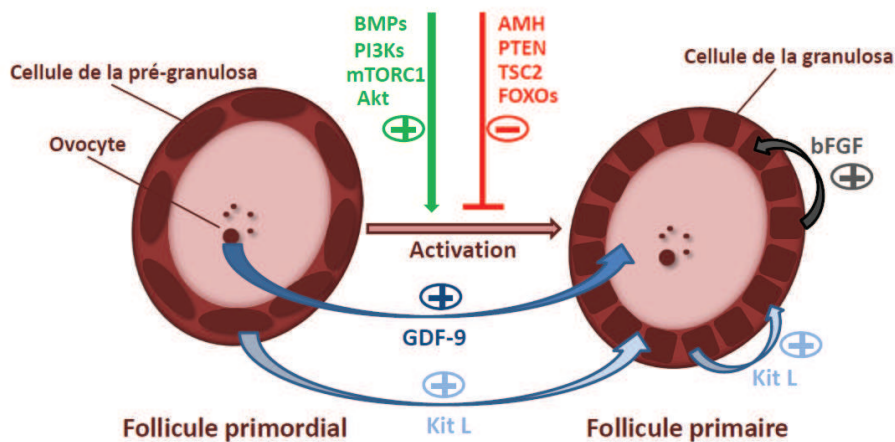


Figure 5. Schéma récapitulatif des différents éléments pouvant être impliqués dans l'activation des follicules primordiaux (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon).

Régulation du développement des follicules primordiaux par les hormones, les facteurs de croissances et les cytokines

L'hormone anti-müllérienne (AMH) n'est pas exprimée par les follicules primordiaux, mais elle possède la capacité de bloquer leur développement (Durlinger *et coll.*, 1999; Durlinger *et coll.*, 2002). Elle est exprimée par les follicules secondaires, pré-antraux et antraux au niveau des cellules de la granulosa (Weenen *et coll.*, 2004). Cette hormone est produite à la 36^{ème} semaine de grossesse puis atteint son niveau le plus haut à la puberté. Les taux d'AMH vont diminuer avec l'âge jusqu'à devenir indétectable à la ménopause (de Vet *et coll.*, 2002) (Figure 6).

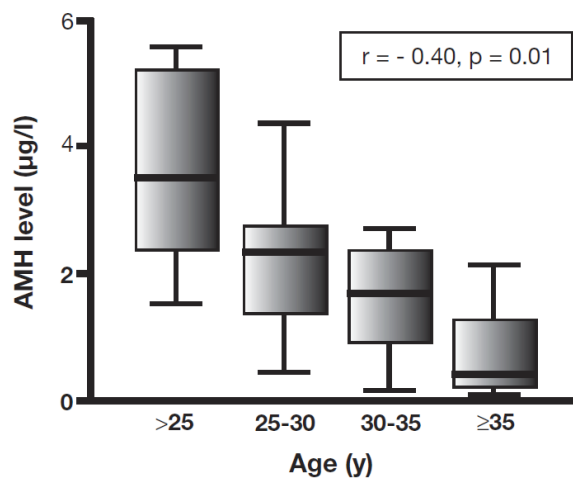


Figure 6. Evolution des taux plasmatiques d'AMH au cours de la vie d'une femme (Visser, 2006).

L'AMH est utilisée comme marqueur d'évaluation de la réserve ovarienne, son taux pouvant être détecté dans un échantillon sanguin (Oktem and Urman, 2010).

- Le facteur de croissance et de différenciation 9 (GDF-9) est un membre de la famille des TGF β , tout comme l'AMH. Il est exprimé par l'ovocyte des follicules primaires. Des expériences de culture de tissus ovariens humains ont permis de démontrer que le GDF-9 avait un rôle dans la survie et l'activation des follicules primordiaux (Hreinsson *et coll.*, 2002).

- La protéine morphogénétique osseuse 15 (BMP-15), pourrait aussi jouer un rôle dans le développement folliculaire, en agissant en synergie avec le GDF-9. La protéine morphogénétique osseuse 14 (BMP-14) qui, contrairement au BMP-15, est exprimée par les cellules stromales ovariennes et par les cellules de la thèque, serait nécessaire à la transition du follicule primordial au primaire (Eppig, 2001; Skinner, 2005).
- Le kit ligand (ou facteur des cellules souches SCF) jouerait également un rôle dans la transition du follicule primordial au follicule primaire, et est exprimé par les cellules de la granulosa des follicules en croissance (Fortune, 2003; Picton, 2001).
- Le facteur de croissance fibroblastique (bFGF), est lui aussi un régulateur positif. Il est exprimé par les cellules de la granulosa des follicules pré-antraux, et non par les follicules primordiaux (Fortune, 2003; Skinner, 2005).
- D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation du développement des follicules primordiaux de manière indirecte. L'activine A est un membre de la famille des TGF β , produit par les cellules de la granulosa des follicules primaires aux follicules antraux (Martins da Silva *et coll.*, 2004). Les effets de l'activine A sur le développement folliculaire sont controversés car des résultats contradictoires ont été observés au cours d'études *in vitro* en fonction de l'âge, de la dose ainsi que du stade de développement des follicules étudiés (Cossigny *et coll.*, 2012; Ding *et coll.*, 2010). Une étude de Ding *et coll.*, réalisée sur des follicules ovariens humains a montré que l'activine A aurait un effet inhibiteur dose-dépendant sur l'activation des follicules primordiaux humains *in vitro*. Cet effet serait indirect car dû à l'action d'autres cellules ovariennes notamment les cellules stromales (Ding *et coll.*, 2010).

Régulation du développement des follicules primordiaux par les molécules de la voie de signalisation des phosphatidylinositol kinases 3 (PI3Ks)

Plusieurs études sur des modèles de souris mutantes ont démontré l'implication de différentes molécules de la voie de signalisation des PI3Ks dans la régulation du développement des follicules primordiaux. Cette voie de signalisation permettrait de maintenir les follicules primordiaux à un niveau basal stable. Néanmoins, une élévation de l'expression des PI3Ks induirait l'activation des follicules primordiaux, et au contraire une suppression de cette voie induirait l'atrésie des follicules primordiaux (Oktem and Urman, 2010; Zheng *et coll.*, 2012) (Figure 7).

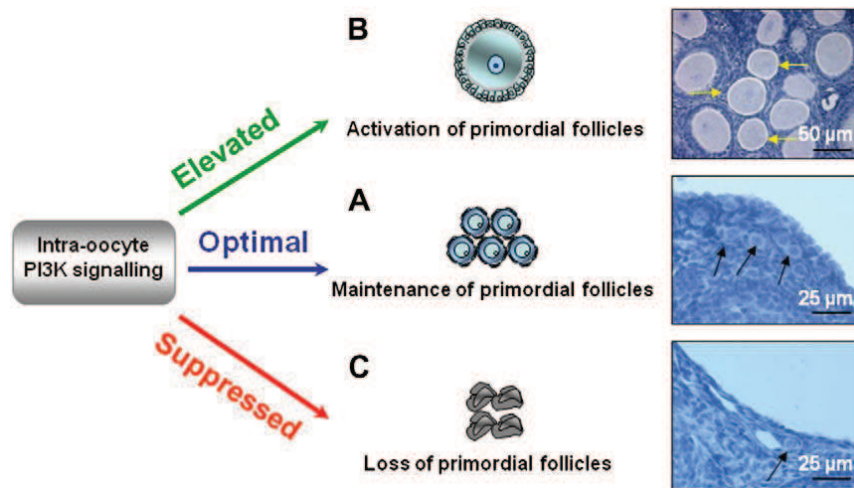


Figure 7. Schématisation de la régulation de la réserve ovarienne par la voie de signalisation des PI3Ks (Zheng *et coll.*, 2012).

Chez les mammifères, les PI3Ks sont des kinases lipidiques responsables de la migration, croissance et prolifération cellulaire. Chez l'homme, les PI3Ks de classe 1a sont activées par de nombreux facteurs de croissance tels que l'insuline, le facteur de croissance épidermique (EGF) ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). Le recrutement des PI3Ks cytoplasmiques vers la membrane interne cellulaire va engendrer la production de phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3) à partir de phosphatidylinositol diphosphate (PIP2) (Adhikari and Liu, 2009).

L'homologue de la tensine et de phosphatase déléetée sur le chromosome 10 (PTEN), est un régulateur négatif des PI3Ks et il est exprimé par les ovocytes des follicules primordiaux. L'implication de la voie des PI3Ks dans la régulation des follicules primordiaux a d'ailleurs été démontrée pour la première fois au cours d'une expérience visant à inhiber le PTEN dans un modèle murin (Lintern-Moore and Moore, 1979). Le rôle du PTEN est de convertir le PIP3 en PIP2, et donc induire la mort des follicules primordiaux (Reddy *et coll.*, 2010).

L'action du PIP3 est de recruter les protéines contenant des domaines de liaison aux lipides à partir du cytoplasme, tel que la protéine kinase B (Akt) (Cantley, 2002).

L'Akt a un rôle clé dans la croissance cellulaire, en inactivant l'action du complexe sclérotique de la tensine 2 (TSC2). L'inactivation du TSC2 va empêcher l'inhibition de la cible de la rapamycine (mTORC1) et donc induire l'activation folliculaire.

Une autre fonction de l'Akt est de supprimer la phosphorylation du facteur de transcription proapoptotique FOXO3, exprimé dans le noyau des ovocytes des follicules primordiaux. Le FOXO3 ayant pour rôle de supprimer l'activation des follicules primordiaux, son inhibition permet une régulation positive de leur développement (Figure 8).

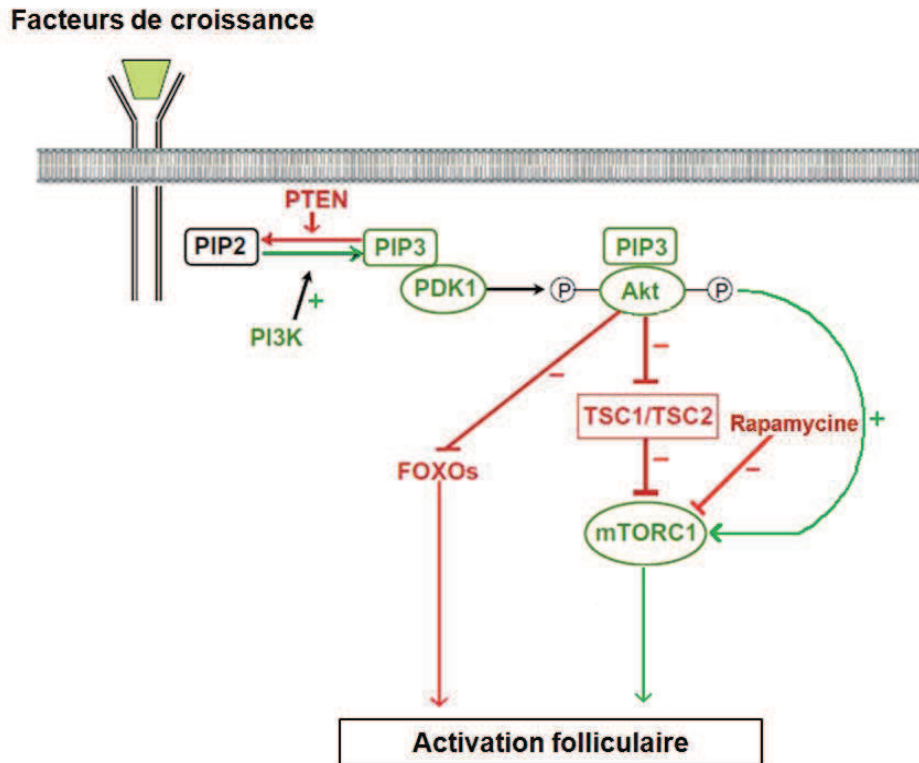


Figure 8. Illustration des principaux éléments de la voie de signalisation des PI3Ks. Les signes « - » correspondent aux signaux d'inhibition et les signes « + » aux signaux d'activation (Modifiée à partir de Zheng *et coll.* (318)).

3.2.2. La croissance basale

Cette phase correspond à l'évolution du follicule secondaire jusqu'au stade pré-antral vascularisé. En effet, au cours de cette phase de croissance, les follicules sont progressivement exposés aux facteurs circulant dans le sang, et les cellules de la granulosa sont très peu sensibles à la FSH. La production d'AMH, qui était quasiment nulle au niveau des follicules primordiaux et primaires, augmente dans les follicules pré-antraux pour atteindre son niveau le plus haut à la fin de la croissance basale.

Le rôle de la FSH ne serait que mineur, car il a pu être démontré que la croissance basale pouvait être maintenue même en l'absence de FSH. La croissance ovocytaire est toujours médiée par les facteurs GDF-9 et BMP-15 principalement. La prolifération des cellules de la granulosa quant à elle serait principalement due à l'expression de l'activine A, de l'EGF, du GDF-9 et du BMP-15 (Gougeon, 2010).

3.2.3. Le recrutement et la sélection

Le recrutement est l'entrée en croissance terminale d'une cohorte de follicules gonado-dépendants. Les follicules sélectionnables ou recrutés, mesurant de 2 à 5 mm, peuvent être observés en échographie tout le long du cycle menstruel. Au cours de cette folliculogénèse terminale, les cellules de la granulosa perdent progressivement leur activité de prolifération et de synthèse de l'AMH, et deviennent sensibles à la FSH (Gougeon, 1998). Leur forte activité mitotique et leur sensibilité à la FSH les distinguent donc des autres follicules. Le nombre de follicules sélectionnables et leur taille va augmenter sous l'action d'hormones gonadotropes.

Le follicule dont les cellules de la granulosa sont les plus sensibles à la FSH sera le premier de la cohorte des follicules sélectionnables à sécréter des œstrogènes. Ce follicule sélectionné, dit dominant, va mesurer entre 5,5 et 8,2 mm. Les œstrogènes ont une action de rétrocontrôle négatif via l'axe hypothalamo-pituitaire et vont donc agir en supprimant la sécrétion pituitaire de FSH. La concentration sanguine en FSH va de ce fait diminuer à un niveau insuffisant pour permettre le développement des autres follicules dont le seuil de sensibilité à la FSH est plus élevé. Ils vont devenir non-ovulatoires et subir une atrophie tandis que le recrutement de nouveaux follicules sera bloqué (Hillier, 1994).

3.2.4. La dominance

Tandis que le « follicule dominant » va continuer sa maturation et sécréter des œstrogènes, le niveau de FSH va drastiquement diminué et les cellules de la granulosa vont acquérir des récepteurs à LH.

La LH va causer l'instabilité des jonctions communicantes présentes entre les cellules de la granulosa, ce qui va engendrer une expansion du complexe cumulo-ovocytaire, nécessaire à l'ovulation.

Le follicule pré-ovulatoire devient encore plus vascularisé. En effet, l'importante vascularisation observée au niveau des cellules de la thèque est une résultante de la prolifération des cellules endothéliales induite par des facteurs angiogéniques tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF).

Le follicule destiné à ovuler est reconnaissable par sa taille. C'est le plus grand des follicules, qui se développe plus rapidement que les autres, et sa production d'œstradiol et d'inhibine est croissante (Gougeon, 2010).

4. Les effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur la fonction ovarienne

Dans le cas de pathologies néoplasiques ou non, l'utilisation de traitements basés sur la chimiothérapie et la radiothérapie peuvent engendrer une altération de la fonction ovarienne. En effet, ces traitements dits gonadotoxiques peuvent diminuer considérablement le capital folliculaire des patientes, et dans ce cas induire une insuffisance ovarienne prématurée ou précoce (IOP). L'IOP correspond à la réduction de la réserve ovarienne ou l'accélération de la perte en follicules avant l'âge de 40 ans. Le risque d'IOP sera dépendant de l'âge de la patiente, de la pathologie associée, du type de traitement utilisé, de sa dose et intensité, ainsi que du moment de l'administration du traitement (Grive and Freiman, 2015).

4.1. Les impacts de la chimiothérapie sur la fertilité féminine

Les agents thérapeutiques utilisés lors d'un traitement par chimiothérapie ont une toxicité variable, et les plus toxiques peuvent induire des dommages au niveau ovarien avec comme mécanisme d'action principal la cassure des brins d'ADN (Familiari *et coll.*, 1993). Les dommages peuvent avoir un effet direct sur les ovocytes (Kim *et coll.*, 2013) ou indirect via une altération des cellules de la granulosa (Perez *et coll.*, 1997). En effet, les dommages causés sur les cellules de la granulosa auront pour conséquence un défaut de communication entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa, et donc une altération de la prolifération ainsi que de la régulation des follicules primordiaux, ce qui va induire leur apoptose (Morgan *et coll.*, 2013).

L'utilisation d'agents chimiothérapeutiques peut avoir deux types d'effets sur la fonction ovarienne :

- Le premier effet est immédiat et moins délétère ; il va provoquer une aménorrhée qui va induire la perte des follicules en croissance mais qui ne concerne pas directement l'altération des follicules primordiaux. La réserve folliculaire n'est donc pas atteinte directement, et les cycles pourront reprendre progressivement, entre 6 à 12 mois après l'arrêt du traitement (Codacci-Pisanelli *et coll.*, 2017). Cependant, les follicules en croissance produisent des facteurs tels que l'AMH responsable de la régulation négative de l'activation des follicules primordiaux. Leur perte va donc générer une dérégulation consistant en un recrutement massif des follicules primordiaux qui vont donc s'activer et à leur tour dégénérer par apoptose. Des cycles répétés de chimiothérapies pourtant considérés comme peu toxiques, peuvent donc affecter le nombre de follicules primordiaux présent dans la réserve ovarienne de manière indirecte (Durlinger *et coll.*, 1999).
- Le deuxième effet est différé et plus grave car il va altérer directement la réserve folliculaire. Les conséquences de cette altération se feront sentir à plus long terme en provoquant la dégénérescence des follicules primordiaux, induisant ainsi une insuffisance ovarienne précoce (Morgan *et coll.*, 2012). Les conséquences de cette altération peuvent se manifester plusieurs années après l'administration du traitement, en fonction du type de traitement, de l'intensité du traitement, du nombre de follicules primordiaux restant chez la patiente au moment de son administration, et ce en fonction de son âge.

La détérioration de la qualité du tissu ovarien peut également être visible, notamment par l'apparition de fibrose au niveau du stroma et de lésions vasculaires importantes (Morgan *et coll.*, 2012).

Le niveau de dommages causés dépend de plusieurs paramètres :

- La nature de l'agent utilisé : la combinaison d'agents chimiothérapeutiques augmente la gravité des dommages engendrés. Aussi, les agents alkylants tels que le cyclophosphamide sont les plus toxiques, surtout à forte dose, en fonction de l'âge de la patiente, tandis que d'autres traitements n'ont aucun impact sur la réserve ovarienne (Elgindy *et coll.*, 2013; Poirot *et coll.*, 2013) (Tableau 1). Les chimiothérapies d'intensification dans le cas de traitement conditionnant à une autogreffe sont également réputées très toxiques pour la fonction ovarienne.

Le pourcentage de défaillances ovariennes prématurées observées après un traitement conditionnant à une greffe a été de 92 à 100 % (Decanter and Robin, 2013).

Risque élevé	Risque modéré	Risque faible ou nul
Agents Alkylants	Agents Alkylants	Agents Alkylants
Cyclophosphamide	Cisplatine	Bleomycine (antibiotique)
Ifosphamide	Carboplatine	Dactinomycine (antibiotique)
Nitrosourée	Doxorubicine	Antimétabolites
Chlorambucile		Méthotrexate
Melphalan		Mercaptopurine
Busulfan		Fluorouracile
Procarbazine		Inhibiteurs des microtubules
		Vincristine
		Vinblastine

Tableau 1. Tableau représentant le niveau de risque de dommages sur la fonction ovarienne en fonction de l'agent chimiothérapeutique utilisé (Tiré de l'article d'Angarita *et coll.* (15)).

- Le protocole établi : la durée du traitement, la dose à administrer, et la dose totale reçue sont des éléments à prendre en compte.
- L'âge de la patiente : plus la patiente est jeune, moins les dommages observés seront importants pour le même traitement administré (Abir *et coll.*, 1998).

Un délai allant de 6 à 12 mois est recommandé après la fin du traitement, surtout par cyclophosphamide, pour les patientes dont la fonction ovarienne est maintenue, avant d'envisager une grossesse (Benard *et coll.*, 2016; Rodriguez-Wallberg and Oktay, 2012a). En effet, les follicules en croissance potentiellement endommagés par le traitement gonadotoxique seraient éliminés durant ce délai (Esposito *et coll.*, 2016).

4.2. Les impacts de la radiothérapie sur la fertilité féminine

La radiothérapie peut être utilisée seule ou en association à la chimiothérapie ou à de la chirurgie, afin de traiter les tumeurs localisées par irradiation.

Elle permet de détruire les cellules cancéreuses, en les empêchant de se multiplier, cependant elle peut également avoir un effet délétère sur la fonction ovarienne ce qui peut engendrer une ménopause précoce ainsi qu'une perte de la production hormonale (hormones gonadotropes) (Thomson *et coll.*, 2002).

Les impacts de la radiothérapie dépendent de la dose de radiation, du fractionnement ou non des séances, du type de pathologie, de la zone irradiée ainsi que de l'âge de la patiente (Critchley and Wallace, 2005; Wallace *et coll.*, 1989). Il a été estimé que même une dose d'irradiation inférieure à 2 Gray (Gy) serait suffisante pour induire la destruction de 50 % des ovocytes immatures (Wallace *et coll.*, 2003). Une relation inversement proportionnelle entre l'âge de la patiente et la dose nécessaire pour induire une altération de la fonction ovarienne a pu être établie (Tableau 2).

Age	Dose (Gray)
Naissance	20,3
10 ans	18,4
20 ans	16,5
30 ans	14,3
35 ans	13
40 ans	11,6

Tableau 2. Tableau représentant les doses limites (en Gray) estimées à partir desquelles une altération de la folliculogenèse est constatée, en fonction de l'âge (Tiré de l'article d'Irtan *et coll.* (146); d'après les données de Wallace *et coll.* (303)).

L'équipe de Wallace *et coll.* a développé un modèle mathématique, basé sur l'équation de Faddy-Gosden (Faddy *et coll.*, 1992), à partir duquel il est possible de déterminer le nombre de follicules primordiaux restant après une irradiation en fonction de l'âge de la patiente (Wallace *et coll.*, 2003) (Figure 9).

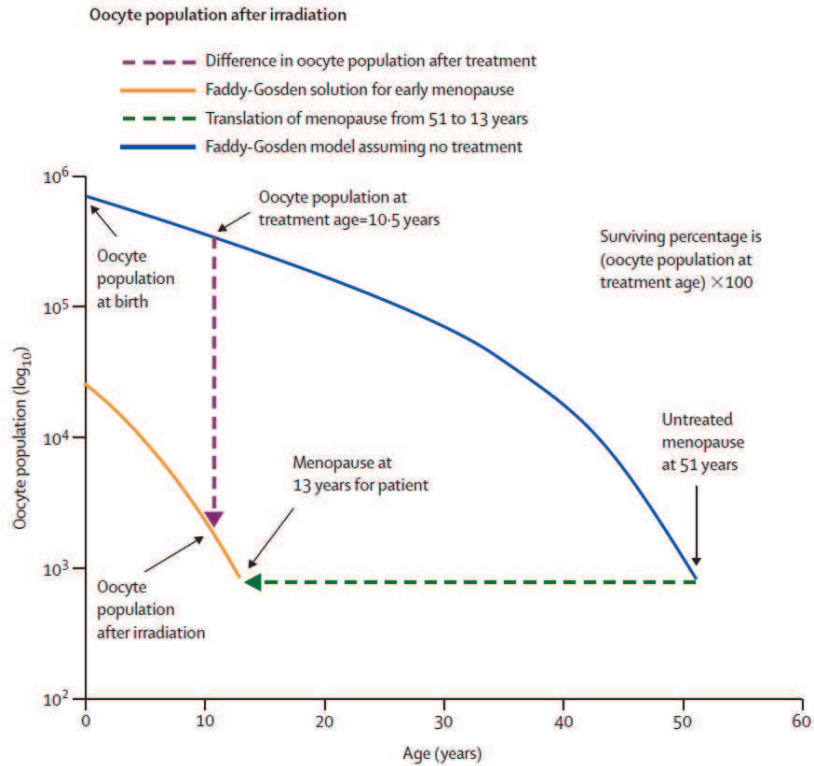


Figure 9. Le modèle Faddy-Gosden (Wallace *et coll.*, 2003).

Les irradiations à risque le plus élevé d'induire une ménopause précoce sont l'irradiation corporelle totale (12 Gy), l'irradiation pelvienne supérieure ou égale à 4 Gy sans transposition ovarienne préalable, et l'irradiation crânienne qui a un impact à distance sur la fonction ovarienne en induisant une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien (Dillon and Gracia, 2012; Sudour-Bonnange *et coll.*, 2013). La combinaison des traitements à risque élevé peut avoir un effet additif et aggraver les effets pré-établis (Sudour-Bonnange *et coll.*, 2013).

L'irradiation corporelle totale est effectuée dans le cadre d'un protocole de conditionnement avant une allo- ou autogreffe de moelle osseuse. Une déplétion des follicules primordiaux a été observée chez 97 % des patientes après une irradiation corporelle totale de 20 à 30 Gy durant l'enfance (Wallace *et coll.*, 1989). Une autre étude ayant suivi au long terme des patientes ayant reçu une irradiation corporelle totale a démontré qu'il y aurait une déplétion ovarienne dans 90 % des cas, que l'irradiation soit fractionnée ou non (Sanders *et coll.*, 1996).

Les fortes doses d'irradiation, supérieures à 24 Gy, utilisées pour le traitement des tumeurs cérébrales sont associées à un risque important de retard de la puberté lié au dérèglement de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien.

En effet, l'atteinte de cet axe peut être à l'origine d'un déficit hormonal qui va induire une aménorrhée, et secondairement une anovulation (Chaput *et coll.*, 2018). Les effets peuvent être progressifs et sont parfois difficiles à diagnostiquer. Les jeunes patientes pré-pubères doivent donc être suivies à intervalles réguliers après la fin de ce type de traitement (Bath *et coll.*, 2001).

Les irradiations de l'utérus peuvent provoquer des restrictions de la capacité utérine ainsi qu'une diminution en apport sanguin durant la grossesse. Ceci a pour conséquence des taux élevés de fausses couches et d'accouchements prématurés, ainsi que la naissance de nouveaux nés dont le poids de naissance est très bas. Cependant, aucune augmentation du risque de malformations congénitales n'a encore été observée. Les dommages seront d'autant plus importants que le volume utérin irradié sera grand (Green *et coll.*, 2009; Rodriguez-Wallberg and Oktay, 2012a).

De nouvelles technologies sont utilisées afin de réduire la toxicité des rayons sur les tissus environnants (Wagner *et coll.*, 2013). En effet, la radiothérapie à intensité modulée est basée sur la reconstruction 3D de la zone à irradier afin de simuler le traitement et d'effectuer des calculs de distribution de la dose optimale à administrer. Ceci permet de protéger les tissus sains en ne les exposant qu'à des doses minimales de radiation. La radiothérapie guidée par l'image permet quant à elle de pouvoir contrôler et corriger la position de la zone cible lors de la séance d'irradiation en prenant en compte les variations anatomiques de la patiente (de Crevoisier *et coll.*, 2009). Ces technologies peuvent être combinées afin d'améliorer le traitement.

5. La préservation de la fertilité féminine

Les connaissances acquises concernant l'impact de certains traitements sur la fonction ovarienne ont permis de développer, depuis plusieurs années, des techniques permettant de préserver la fertilité des patientes. En France, les lois de bioéthiques de 2011 définissent les indications de préservation de la fertilité telles que « Toute personne dont la prise en charge est susceptible d'altérer la fertilité, ou dont la fertilité risque d'être prématurément altérée, peut bénéficier du recueil et de la conservation de ses gamètes ou de ses tissus germinaux, en vue de la réalisation ultérieure, à son bénéfice, d'une assistance médicale à la procréation, ou en vue de la préservation et de la restauration de sa fertilité » (La loi (n°2011-814) relative à la bioéthique, 2011).

5.1. Les indications de préservation de la fertilité féminine

La préservation de la fertilité reste un enjeu majeur, particulièrement dans le cas de pathologies hématologiques, telles que les lymphomes Hodgkinien et non Hodgkinien, les leucémies, mais également le cancer du sein. En effet, les patientes présentant ces pathologies sont le plus fréquemment orientées vers des techniques de préservation de la fertilité, compte-tenu de la gonadotoxicité des traitements (radiothérapie, chimiothérapie, chirurgie) nécessaires à leur guérison (Donnez and Dolmans, 2017).

Le risque d'atteinte de la fonction ovarienne des patientes traitées varie en fonction de la pathologie, du traitement envisagé (type de traitement, dose, durée) ainsi que de leur âge. Le tableau ci-dessous liste les différentes pathologies pour lesquelles une indication de préservation de la fertilité féminine est nécessaire, ainsi que la gravité du risque d'atteinte de la fonction ovarienne associées (Tableau 3) :

Pathologies néoplasiques	Pathologies non néoplasiques
Maladies systémiques Lymphomes (Hodgkinien ou non) Leucémies Médulloblastome	Ovariectomie unilatérale ou bilatérale Tumeurs ovariennes bénignes Endométrioses sévères et récurrentes Mutations BRCA-1 ou BRCA-2
Pathologies extra-pelviennes Cancers osseux (ostéosarcome, sarcome d'Ewing) Cancer du sein Mélanome Neuroblastome Cancer de l'intestin	Risques de ménopause précoce Syndrome de Turner Maladies nécessitant une chimiothérapie: Lupus érythromateux Arthrite rhumatoïde Maladie de Behçet Granulomatose de Wegener
Pathologies pelviennes Sarcomes Rhabdomyosarcomes Tumeurs sacrées Tumeurs recto sigmoïdiennes Cancer cervical primitif Cancer vaginal primitif Cancer vulvaire primitif Carcinome ovarien (stade IA) Tumeur borderline de l'ovaire	Pathologies nécessitant une greffe de cellules souches hématopoïétiques Maladies auto-immunes ne répondant pas aux traitements par immunosuppresseur Maladies hématologiques bénignes: Drépanocytose Thalassémie majeure Anémie aplasique

Risque faible (<20%)	Risque modéré (20-80%)	Risque élevé (>80%)
Leucémie aigue lymphoblastic Tumeur de Wilm Sarcome des tissus mous : Stage 1 Tumeurs des cellules germinales: si pas de radiothérapie Retinoblastome Tumeurs du cerveau : si irradiation craniale <24 Gy	Leucémie aigue myéloïde Hépatoblastome Osteosarcome Sarcome d'Ewing non-métastatique Sarcome des tissus mous : Stage 2 ou 3 Neuroblastoma Lymphome non-Hodgkinien Lymphome Hodgkinien Tumeurs du cerveau : si irradiation craniale >24 Gy	Irradiation corporelle totale Irradiation pelvienne Chimiothérapie conditionnante pour greffe de moelle osseuse Agents alkylants pour le traitement de lymphome d'Hodgkin Sarcome d'Ewing métastatique

Tableau 3. Les pathologies relevant d'une indication pour la préservation de la fertilité féminine (haut) et la gravité du risque d'atteinte de la fonction ovarienne associées (bas) (D'après Donnez and Dolmans (87)).

Il faut noter que la préservation de fertilité dite « sociétale », sans motif médical, ne peut pas être considéré comme une altération de la fertilité et n'est donc de ce fait pas autorisée actuellement en France, contrairement à d'autres pays (Benard *et coll.*, 2016).

5.2. Les différentes stratégies de préservation de la fertilité féminine (Figure 10)

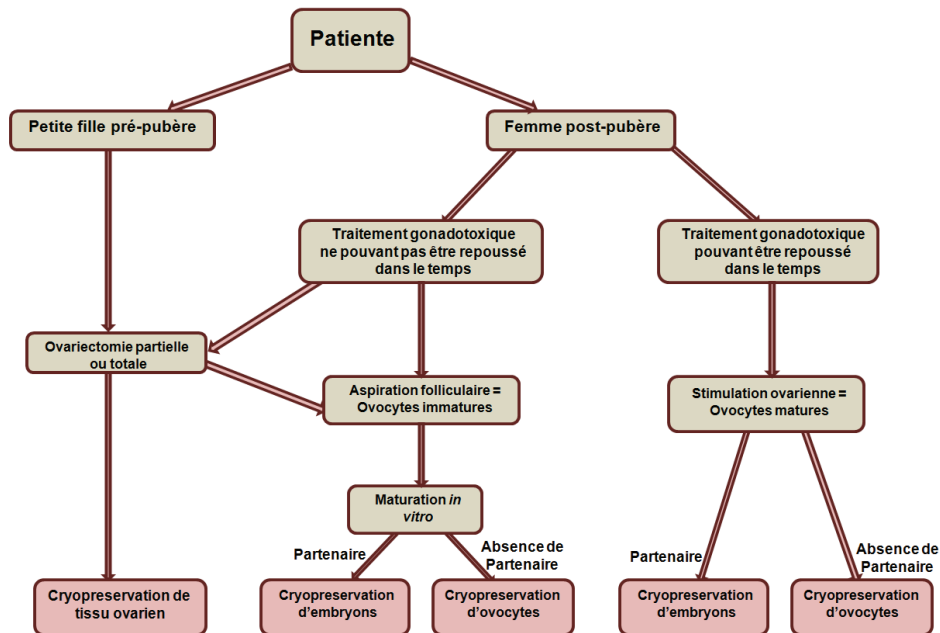


Figure 10. Schéma représentant les différentes stratégies de préservation de la fertilité pour les patientes atteintes d'un cancer (Modifié à partir d'Anderson *et coll.* (14) et Chian *et coll.* (52)).

5.2.1. La cryopréservation d'embryons

La cryopréservation d'embryons a été la première technique de préservation de la fertilité pour les femmes en couple validée et utilisable en routine. Cette technique peut être proposée lorsque les indications le permettent, pour les patientes pouvant bénéficier d'une stimulation ovarienne pour raison médicale. La cryopréservation d'embryons peut être effectuée uniquement pour les femmes en âge de procréer ayant un conjoint. Les embryons obtenus sont la propriété du couple, ainsi si le couple se sépare les embryons ne pourront plus être utilisés. Dans certains pays, le don de sperme peut également être possible pour les patientes seules désirant effectuer une cryopréservation d'embryons (Angarita *et coll.*, 2016; Courbiere *et coll.*, 2013; Poirot *et coll.*, 2013).

Lorsque les follicules ont atteint la taille appropriée, ils sont aspirés par ponction transvaginale écho-guidée afin de récupérer les complexes cumulo-ovocytaires (CCO).

Ensuite, soit les CCO sont mis en contact avec des spermatozoïdes dans un milieu de culture : c'est la fécondation *In Vitro* (FIV); soit un spermatozoïde est directement microinjecté dans l'ovocyte mature : c'est alors une FIV avec ICSI (« IntraCytoplasmic Sperm Injection ») (Angarita *et coll.*, 2016)). Les congélations sont souvent effectuées 2 à 3 jours ou 5 à 6 jours après que la fécondation a eu lieu (Poirot *et coll.*, 2013).

Dans une récente étude de Dolmans *et coll.*, le pourcentage de grossesses pour les femmes ayant eu recours à une cryopréservation embryonnaire était estimé à 66 %, et le pourcentage de naissance était de 44 % (Dolmans *et coll.*, 2015).

Une autre étude de Cardozo *et coll.*, a consisté à comparer les résultats obtenus après transfert d'embryons cryoconservés de patientes atteintes de cancer et ceux de femmes en parcours d'assistance médicale à la procréation d'âge similaire, sur une période de 17 ans (1997 à 2014). Il en résulte qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les patientes traitées et les patientes « contrôles » en ce qui concerne le nombre d'embryons obtenus (6,6 contre 6,7 embryons pour les femmes saines), le pourcentage de grossesse par transfert (37 % contre 43 % pour les femmes saines) et également le pourcentage de naissance (30 % contre 32 % pour les femmes saines) (Cardozo *et coll.*, 2015).

Dans ces deux études, le pourcentage de patientes souhaitant réutiliser leurs embryons cryopréservés après leur rémission était respectivement de 33 % et de 23 % (Cardozo *et coll.*, 2015; Dolmans *et coll.*, 2015).

La cryopréservation d'embryons comporte toutefois certaines contre-indications. En effet, pour les patientes dont le traitement ne peut être repoussé dans le temps, cette technique est inenvisageable sachant que l'obtention d'embryons nécessite une stimulation ovarienne préalable qui peut aller de 10 à 15 jours (Angarita *et coll.*, 2016).

5.2.2. La cryopréservation d'ovocytes matures

Depuis 2011, la cryopréservation d'ovocytes matures n'est plus considérée comme expérimentale en France (La loi (n°2011-814) relative à la bioéthique, 2011; Règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation, 2017). Elle permet aux femmes célibataires et aux adolescentes d'avoir une alternative à la cryopréservation d'embryons.

Toutefois, la cryopréservation d'ovocytes matures nécessite également une stimulation ovarienne préalable, et ne peut pas être appliquée aux petites filles prépubères (Angarita *et coll.*, 2016; Salama *et coll.*, 2016). Afin de pouvoir effectuer une cryopréservation ovocytaire chez des patientes, le traitement envisagé doit pouvoir être repoussé d'au moins 10 à 12 jours (Donnez and Dolmans, 2017). Cette technique ne peut donc pas être proposée aux patientes dont l'administration d'un traitement hautement gonadotoxique ne peut être repoussée dans le temps.

La congélation lente et la vitrification sont les deux techniques permettant de préserver des ovocytes matures. La congélation lente a été la première technique utilisée afin de cryoconserver des ovocytes matures (Chen, 1986). Cette technique consiste à mettre les ovocytes dans un milieu de congélation contenant des agents cryoprotecteurs, puis à l'aide d'un congélateur programmable, de procéder à une congélation progressive dite « lente » pour éviter la formation de glace intracellulaire (Smith *et coll.*, 2010).

La vitrification quant à elle consiste à mettre les ovocytes en contact avec des agents cryoprotecteurs à des concentrations élevées, afin de procéder à une congélation ultra-rapide dans le but d'obtenir un état solide amorphe qui permet également d'éviter la formation de cristaux de glace (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013)).

Plusieurs méta-analyses ont montrées que l'utilisation d'ovocytes vitrifiés permettait d'obtenir de meilleurs taux de grossesses que l'utilisation d'ovocytes frais (Cobo *et coll.*, 2010; Oktay *et coll.*, 2006). La survie des ovocytes, la morphologie des embryons obtenus et les taux de grossesses semblent également être meilleurs après vitrification, en comparaison à la congélation lente (Glujovsky *et coll.*, 2014; Smith *et coll.*, 2010). Il a été estimé qu'un minimum de 20 ovocytes vitrifiés était nécessaire afin d'obtenir une naissance (Donnez and Dolmans, 2013). En effet, la probabilité d'obtenir une naissance augmente exponentiellement en fonction du nombre d'ovocytes recueillis, avec un maximum atteint lorsque 40 ovocytes sont recueillis (Cobo *et coll.*, 2016; Cobo *et coll.*, 2015).

Il existe deux systèmes de vitrifications, un système ouvert et un système fermé. Le système ouvert, les ovocytes contenus dans un milieu cryoprotecteur sont en contact avec l'azote liquide, ce qui peut poser des problèmes quant à la contamination des ovocytes exposés. Alors que dans le système fermé, les ovocytes sont dans une paillette, il n'y a donc aucun contact avec l'azote liquide (Glujovsky *et coll.*, 2014). Le développement de techniques consistant à utiliser de l'azote liquide stérilisé aux rayons ultra-violets pourrait éviter de potentielles contaminations d'un système ouvert (Parmegiani *et coll.*, 2012).

Il a récemment été démontré que la survie des ovocytes était similaire après vitrification dans un système ouvert ou fermé lorsque les mêmes agents cryoprotecteurs étaient utilisés (Gook *et coll.*, 2016).

Une revue rétrospective de 2015 a répertorié les cryopréservations d'ovocytes réalisées entre 2005 et 2014 chez des patientes atteintes de cancer. Sur les 176 patientes en rémission, seules 6 % ont souhaité utiliser leurs ovocytes cryoconservés. Le taux de naissance a été de 44 % pour les patientes atteintes de cancer; ce qui a été comparable au taux obtenu pour les femmes saines ayant eu recours à une assistance médicale à la procréation (33 %) (Druckenmiller *et coll.*, 2016), comme cela avait déjà été décrit précédemment par d'autres groupes (Doyle *et coll.*, 2016; Martinez *et coll.*, 2014).

Malgré de nombreuses interrogations, le risque d'anomalies congénitales chez les enfants issus de l'utilisation d'ovocytes congelés par congélation lente (Noyes *et coll.*, 2009) ou par vitrification ne serait pas plus élevé (Chian *et coll.*, 2008), ceci même après une cryoconservation longue (3,5 ans en moyenne (Goldman *et coll.*, 2015)). Jusqu'à présent, plus de 3000 naissances ont été reportées après utilisation d'ovocytes cryoconservés sans avoir observé une augmentation significative des anomalies congénitales (Druckenmiller *et coll.*, 2016).

5.2.3. La cryopréservation de tissu ovarien

La cryopréservation de tissu ovarien (CTO) est actuellement la seule technique envisageable pour les petites filles prépubères, les femmes dont le traitement hautement gonadotoxique ne peut être repoussé dans le temps et les femmes pour lesquelles la stimulation ovarienne est contre-indiquée (Donnez *et coll.*, 2006).

Le prélèvement et la conservation de tissu ovarien sont à l'heure actuelle considérés comme des activités de soin effectuées dans des centres d'assistance médicale à la procréation, tandis que sa réutilisation par autogreffe est toujours considérée comme expérimentale conformément aux guides des bonnes pratiques (La loi (n°2004-800) relative à la bioéthique, 2004; La loi (n°2011-814) relative à la bioéthique, 2011).

L'évolution d'une maladie peut parfois être imprévisible, et il peut être difficile d'évaluer l'impact que celle-ci pourrait avoir sur la fertilité de la patiente.

De plus, certaines patientes peuvent être classées comme présentant une maladie à faible risque d'impact sur la fertilité lors du diagnostic, alors que leur état va évoluer et nécessiter une prise en charge supplémentaire, les faisant passer dans la catégorie à haut risque. La persistance d'une fonction ovarienne normale après traitement n'exclut pas un risque d'insuffisance ovarienne précoce (Jadoul *et coll.*, 2010).

Afin de faciliter la prise en charge des patientes, des critères d'inclusion ont été établis par des sociétés savantes afin de déterminer au mieux quelles patientes pourraient bénéficier d'une CTO. Au sein de notre centre, les recommandations du Groupe de Recherche et d'Etude sur la Cryoconservation de l'Ovaire et du Testicule (GRECOT) pour l'inclusion des patientes sont : un âge inférieur ou égal à 35 ans, ainsi qu'un risque élevé d'insuffisance ovarienne prématurée.

La CTO peut être réalisée alors que la chimiothérapie a débuté quel que soit le moment du cycle menstruel, ce qui permet de ne pas retarder l'instauration du traitement, même si il est préconisé de la réaliser avant la chimiothérapie (Desvignes *et coll.*, 2014). Il s'agit d'une procédure assez courte, qui dure 30 minutes en moyenne lorsqu'elle est effectuée par cœlioscopie (Mayerhofer *et coll.*, 2010). Le prélèvement de fragments de tissu ovarien ou l'ovaire entier peut être effectué par cœlioscopie. A l'issue de cette procédure, seule la partie corticale de l'ovaire est conservée, tandis que la médullaire est éliminée. Seule la médullaire en contact direct de la corticale est conservée. En effet, des études ont montré qu'il y avait un nombre important de follicules primordiaux plus en profondeur dans l'ovaire, qui vont migrer du fait de la croissance folliculaire, provoquant leur enfouissement au niveau de la région médullaire (Kristensen *et coll.*, 2011; Yin *et coll.*, 2016a). Il est recommandé d'avoir des fragments d'environ 1 à 2 mm d'épaisseur afin d'obtenir un nombre suffisant de follicules primordiaux (Silber, 2016) (Figure 11). En effet, des fragments trop fins pourrait être dépourvus de follicules. Le nombre de fragments recueillis dépend de l'âge de la patiente et de la taille de l'ovaire (Donnez *et coll.*, 2015).

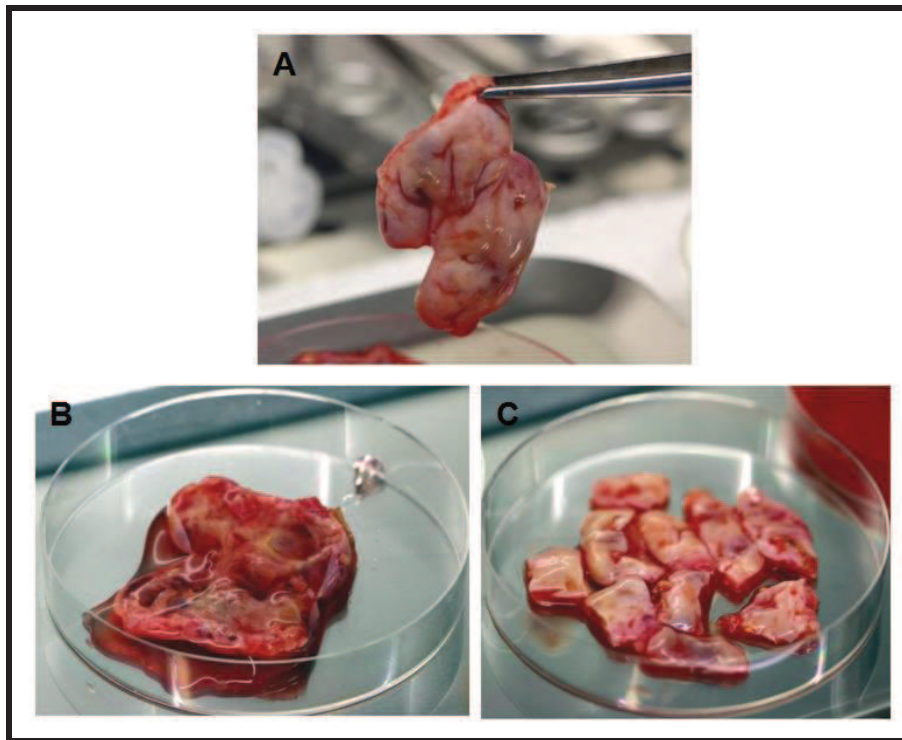


Figure 11. Photos montrant la technique de découpe de l’ovaire après ovariectomie. A. Ovaire coupé transversalement, avant retrait de la médullaire ; B. Ovaire coupé transversalement, après retrait de la médullaire ; C. Fragments de cortex ovariens avant la congélation (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon).

La méthode standard pour congeler les fragments de cortex ovarien est la congélation lente, cependant la vitrification peut également être utilisée et semble donner des résultats comparables en termes de préservation de la qualité et viabilité folliculaire (Amorim *et coll.*, 2011; Keros *et coll.*, 2009; Klocke *et coll.*, 2015). Une fois congelés, les fragments peuvent être conservés dans l’azote liquide durant plusieurs années (Salama *et coll.*, 2016).

Même si différentes stratégies, telles que la culture *in vitro* de follicules ovariens isolés, sont envisagées, l’autogreffe de fragments de cortex ovarien est l’unique technique de réutilisation des fragments cryoconservés appliquée en clinique chez les patientes. La première greffe de tissu ovarien chez l’Homme a été publiée en 2000 par Oktay *et coll.*, (Oktay and Karlikaya, 2000). La quantité de fragments de cortex ovarien nécessaire à la greffe dépend du type de traitement envisagé lié au risque estimé d’insuffisance ovarienne précoce, du volume existant de fragments cryoconservés ainsi que de l’âge de la patiente (Donnez and Dolmans, 2013). La greffe des fragments de cortex ovarien peut être effectuée en site orthotopique ou hétérotopique.

La greffe orthotopique

La greffe orthotopique consiste à greffer les fragments de cortex ovarien au niveau de la cavité pelvienne, soit au niveau de l'ovaire restant soit au niveau de la fossette ovarienne. Les fragments peuvent être placés au niveau de la médullaire qui est richement vascularisé puis fixé à l'aide d'une colle de fibrine ou de points de suture. Les fragments peuvent également être placés dans une fenêtre péritonéale à proximité de l'ovaire restant.

La première naissance après greffe orthotopique a eu lieu en 2004 (Donnez *et coll.*, 2004). A ce jour plus de 130 naissances ont été reportées au monde (Donnez and Dolmans, 2017; Donnez and Dolmans, 2015; Jensen *et coll.*, 2017), toutefois il reste difficile de répertorier toute les greffes qui ont pu avoir lieu (Donnez *et coll.*, 2013) (Figure 12). Une étude a récolté les résultats de 5 centres (Danemark, Espagne, Belgique, Allemagne, Australie) (Donnez *et coll.*, 2015). Dans ces centres, au total 111 greffes ont été effectuées, et parmi celles-ci 32 ont abouti à une naissance. Une récente étude rétrospective de Jensen *et coll.*, a permis de regrouper de nouvelles naissances ayant eu lieu et ainsi de préciser le taux de naissance post-greffe à environ 31 %, ainsi qu'un taux de grossesse de 23 à 37 % (Jensen *et coll.*, 2017; Ladanyi *et coll.*, 2017). D'après une méta-analyse de Padocha and Oktay, le taux de grossesses + naissances, calculé à partir du nombre total de femmes transplantées, serait de 38 % après greffe orthotopique (Pacheco and Oktay, 2017).

Publications	Technique de cryopreservation	Nombre de femmes ayant été autogreffées	Nombre de naissances (+X) = grossesse en court
(Donnez <i>et coll.</i> , 2004; Donnez <i>et coll.</i> , 2011)	CL	19	8 (+1)
(Meirow <i>et coll.</i> , 2005)	CL	ND	6
(Demeestere <i>et coll.</i> , 2015)	CL	ND	3
(Andersen <i>et coll.</i> , 2008)	CL	25	8
(Silber <i>et coll.</i> , 2008)	CL	6	4
(Piver <i>et coll.</i> , 2009; Roux <i>et coll.</i> , 2010)	CL	ND	3 (+1)
(Sanchez-Serrano <i>et coll.</i> , 2010)	CL	33	6 ^a (+3)
(Revel <i>et coll.</i> , 2011)	CL	ND	2
(Dittrich <i>et coll.</i> , 2012)	CL	20	6
(Revelli <i>et coll.</i> , 2013)	CL	ND	1
(Callejo <i>et coll.</i> , 2013)	CL	ND	1
(Stern <i>et coll.</i> , 2014; Stern <i>et coll.</i> , 2013)	CL	14	3 ^a
(Kawamura <i>et coll.</i> , 2013; Suzuki <i>et coll.</i> , 2015)	V	ND	2
(Burmeister <i>et coll.</i> , 2013)	CL	2	1
(Rodriguez-Wallberg <i>et coll.</i> , 2015)	CL	6	1
(Tanbo <i>et coll.</i> , 2015)	CL	2	2
Agarwal <i>et al.</i> (Communication personnelle)	CL	ND	1
Malkolkin <i>et al.</i> et Kalugina <i>et al.</i> (Communication personnelle)	CL	ND	2
(D'après les données de (Donnez and Dolmans, 2015))			
(Silber <i>et coll.</i> , 2015)	CL (1997-2008) ; V (2008 jusqu'à maintenant)	5	2 (CN)
(Oktay <i>et coll.</i> , 2016)	CL	ND	1
(Meirow <i>et coll.</i> , 2016)	CL	ND	4 (+2)
Les pays nordiques (Rodriguez-Wallberg <i>et coll.</i> , 2016)	CL (V pour la Suède)	14	7 (+2)
Le réseau FertiPROTEKT (Van der Ven <i>et coll.</i> , 2016)	CL	54	11
(Dunlop <i>et coll.</i> , 2016)	CL	ND	1
(Nouvelles publications d'après (Jensen <i>et coll.</i>, 2017))			

Figure 12. Série des 86 naissances publiées et obtenues après autogreffe de cortex ovarien cryoprésumé au monde. CL = congélation lente ; V = vitrification ; ^a = jumeaux ; ND = données non disponibles ; CN = conception naturelle (D'après Jensen *et coll.* (150) et Donnez and Dolmans (88)).

L'avantage de la greffe orthotopique réside dans le fait que l'environnement dans lequel les fragments sont implantés est plus favorable au développement folliculaire en termes d'oxygénation, de pression et également par la présence de fluide péritonéal. De plus, cette procédure permet à la patiente de pouvoir concevoir naturellement si les trompes de Fallope sont toujours intactes. Le pourcentage de femme ayant pu concevoir naturellement après greffe orthotopique est estimé à environ 60 % (Dolmans *et coll.*, 2013; Pacheco and Oktay, 2017). Sur toutes les naissances obtenues à ce jour, seule une malformation majeure a été observée (l'arthrogrypose, une maladie neuromusculaire congénitale non-évolutive), ce qui équivaut à un taux de malformation de 1,2 %. Ce taux est similaire à celui évalué dans la population générale, qui est de 1 à 2 % (Meirow *et coll.*, 2016).

La greffe hétérotopique correspond à une implantation des fragments de cortex ovarien en dehors de la cavité péritonéale, tel qu'au niveau de l'avant-bras ou de l'abdomen (Donnez and Dolmans, 2013).

La greffe hétérotopique au niveau de la cavité abdominale

La première naissance après greffe hétérotopique a été reportée en 2013 (Stern *et coll.*, 2013). Une patiente ayant été traitée pour une tumeur des cellules de la granulosa et subit une double ovariectomie a été greffée deux fois au niveau de la cavité pelvienne et de la paroi abdominale. La deuxième greffe a permis la naissance de jumelles après transfert de deux embryons. Malgré le succès de cette greffe, sa localisation au niveau pelvien pourrait être comparable à une greffe orthotopique (Suzuki and Donnez, 2016).

La greffe hétérotopique au niveau du bras ou sus-pubien

Une deuxième greffe hétérotopique a récemment été répertoriée dans le cas d'une patiente ayant souffert d'un cancer du sein. La greffe hétérotopique a eu lieu au niveau supérieur du ligament sacro-utérin, ce qui a permis la naissance de jumeaux (Kristensen *et coll.*, 2017).

Des grossesses spontanées obtenues par restauration de la fonction endocrine ont également été observées après greffe hétérotopique. En effet, trois naissances ont été reportées après greffe sous-cutanée au niveau sus-pubien (Oktay, 2006; Oktay *et coll.*, 2011). Même si aucune fonction ovarienne n'avait été observée avant la greffe et que les ovaires des patientes étaient atrophiés, la possibilité que ces patientes aient été enceintes même sans la greffe ne peut pas être écartée principalement car la reprise d'une fonction ovarienne peut prendre du temps après l'utilisation d'un traitement gonadotoxique. De plus, une hypothèse a été émise, selon laquelle les ovocytes pourraient se régénérer à partir de cellules souches germinales provenant de l'ovaire restant, ou migrant à partir de la moelle osseuse (Oktay *et coll.*, 2011; Rodriguez-Wallberg and Oktay, 2012b).

La greffe hétérotopique sous-cutanée est une procédure moins invasive et moins coûteuse que la greffe orthotopique. Elle a pour avantage majeur de faciliter l'accès aux follicules post-greffe, aussi le nombre de fragments greffés n'est pas limité par la taille du site de transplantation (Rodriguez-Wallberg and Oktay, 2012a; Rodriguez-Wallberg and Oktay, 2012b). Toutefois, les sites de greffe hétérotopique restent moins optimaux en raison de paramètres tels que la température, la pression, les échanges paracrines et les apports sanguins, qui ne sont pas les mêmes que pour une greffe orthotopique (Kristensen *et coll.*, 2017).

Il faut environ 6,5 mois pour observer des signes de reprises de la fonction ovarienne après greffe (diminution de la FSH et augmentation des taux d'œstradiol ; (Dolmans *et coll.*, 2013)). En général, l'observation d'une croissance folliculaire nécessite plus de 120 jours post-greffe. La durée de vie moyenne du greffon est évaluée entre 4 à 5 ans, il est donc possible pour les patientes de concevoir plusieurs fois après une seule procédure (Donnez and Dolmans, 2013). La longévité moyenne des fragments de tissu ovarien cryoconservés ayant permis d'obtenir une naissance après greffe orthotopique est actuellement de 24,9 mois (durée minimum : 4 mois, durée maximum : 144 mois), avec une grande variabilité entre les études publiées (Pacheco and Oktay, 2017). Cette durée varie en fonction de plusieurs facteurs tels que la réserve ovarienne, l'administration d'une chimiothérapie avant la cryopréservation, la taille des fragments, les techniques de congélation utilisée, et la densité folliculaire qui peut être très hétérogène en fonction des fragments et des patientes.

Peu de naissances ont été reportées chez des patientes dont les fragments de cortex ovarien auraient été cryopréservés au stade pré-pubère, étant donné que ces patientes sont encore trop jeunes pour émettre un désir d'enfant. En 2016, la première naissance après greffe de tissu ovarien, cryoconservé durant l'enfance, a été obtenue chez une femme de 27 ans souffrant à l'époque d'une anémie falciforme sévère. En effet, l'ovaire droit de la patiente a été retiré et 62 fragments ont pu être cryoconservés lorsque celle-ci était âgée de 13 ans. A l'époque, elle n'avait pas encore eu ses menstruations, mais présentait quelques signes de puberté (développement mammaire à 10 ans). Lorsque la patiente a émis un souhait de grossesse, 15 fragments ont été décongelés, puis greffés en sites orthotopique (ovaire restant et bourse péritonéale) et hétérotopique (sous-cutané). Ces greffes ont donné lieu à une grossesse spontanée suivie d'une naissance 2 ans après les greffes (Demeestere *et coll.*, 2015).

Il a également été possible d'induire la puberté après autogreffe de fragments de cortex ovarien cryoconservés avec succès chez plusieurs fillettes pré-pubères (Ernst *et coll.*, 2013; Poirot *et coll.*, 2012). Malgré les résultats prometteurs d'induction de la puberté par transplantation de tissus ovariens cryoconservés, les thérapies actuelles de traitements hormonaux substitutifs restent les méthodes recommandées, car elles permettent une distribution en hormones progressive et modifiable au cours du temps. Un récent rapport a indiqué que la greffe engendrerait une production importante et soudaine en estrogènes, qui à terme pourrait provoquer des troubles de la puberté tels qu'une prise de poids anormale, un arrêt prématuré de la croissance ainsi que des problèmes cutanés (von Wolff *et coll.*, 2016).

Plus de 50 % des follicules primordiaux sont perdus après la greffe, ceci du fait de leur activation prématurée. En effet, l'activation des follicules primordiaux peut induire un décalage de maturation entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa et donc favoriser la présence de follicules vides.

La revascularisation des fragments ne commence que 5 jours après la greffe. L'existence d'un réseau vasculaire en amont de la greffe à proprement dite améliore les taux de revascularisation, c'est ce qu'on appelle la greffe en deux temps (Van Eyck *et coll.*, 2010). La greffe en deux temps consiste à effectuer une incision au niveau du site de greffe afin de stimuler la néoangiogenèse et d'y placer quelques fragments en préparation de la greffe à proprement-dite (Donnez *et coll.*, 2004; Roux *et coll.*, 2010). Afin de stimuler la vascularisation, l'injection de facteurs angiogéniques (VEGF) ou anti-apoptotiques (IGF, GDF-9) a été proposée. Cependant, l'efficacité de cette technique n'a pas encore pu être démontrée chez les patientes (Van Eyck *et coll.*, 2010).

La transplantation d'un ovaire entier avec son pédicule vasculaire permettrait d'éviter l'ischémie post-greffe et pourrait être la meilleure approche pour limiter la perte folliculaire (Martinez-Madrid *et coll.*, 2004; Martinez-Madrid and Donnez, 2007). Cette technique n'a pas encore permis d'obtenir une naissance par autogreffe d'un ovaire entier cryopréservé, cependant une naissance par allogreffe d'un ovaire entier frais entre deux sœurs jumelles monozygotes a pu être obtenue (Bedaiwy *et coll.*, 2006; Silber *et coll.*, 2008).

La greffe d'ovaire entier cryoconservé a plusieurs inconvénients : d'un point de vue chirurgical, l'anastomose vasculaire s'avère être compliquée à cause de la petite taille du pédicule ovarien et des artères ovariennes. De plus, la congélation d'un ovaire est plus difficile et peut ne pas être homogène. Elle nécessite une perfusion *ex vivo* de l'ovaire, à travers l'artère, afin d'y diffuser le milieu de congélation (Ali Mohamed, 2017). Enfin, il y a un risque plus important de complications post-opératoires telles qu'une hémorragie, un anévrisme, une sténose ou une thrombose. Sans oublier le risque encore plus élevé de réintroduire des cellules malignes chez la patiente en cas de pathologie cancéreuse à haut risque de localisation métastatique ovarienne (Martinez-Madrid *et coll.*, 2004).

5.2.4. La maturation *in vitro* des complexes cumulo-ovocytaires des follicules antraux

La maturation *in vitro* (MIV) consiste à récupérer des ovocytes immatures à partir de la ponction de follicules antraux visibles, pour les faire murer *in vitro* (Segers *et coll.*, 2015; Uzelac *et coll.*, 2015) (Figure 13). La MIV a pour avantage de pouvoir être effectuée quelle que soit la phase du cycle menstruelle, et d'être associée à la cryopréservation de tissu ovarien (CTO) afin de maximiser les chances de réussite, sachant que la CTO ne permet de conserver que les follicules primordiaux à secondaires (Berwanger *et coll.*, 2012; Chian *et coll.*, 2013). Cependant, le pourcentage de grossesses après MIV, d'environ 20-30 %, reste plus faible que les techniques conventionnelles de fécondation *in vitro* classiques (Chang *et coll.*, 2014).

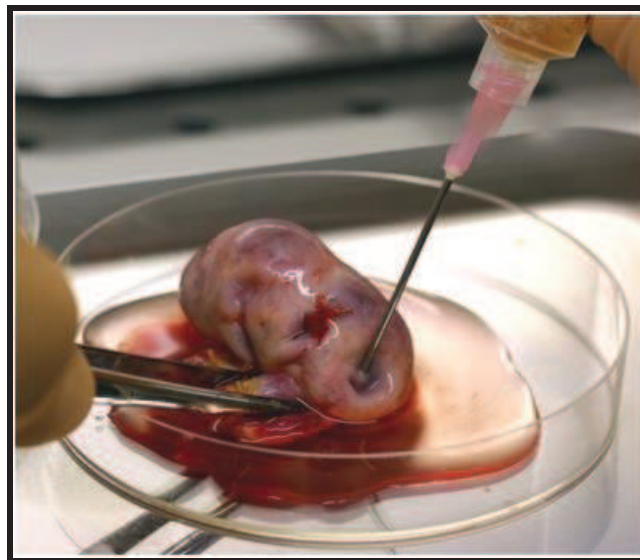


Figure 13. Photo montrant la technique d'aspiration des follicules antraux au niveau cortical de l'ovaire (Service de Biologie et de Médecine de la Reproduction, Cryobiologie - CHRU Besançon).

Il existe actuellement trois protocoles de culture pour la MIV:

- la première méthode consiste à mettre directement les ovocytes dans le milieu de maturation sans ajout d'hormones,

- la deuxième consiste à enrichir le milieu de maturation avec de la FSH afin d'augmenter le taux de maturation des ovocytes immatures, cette technique s'appelle « FSH *priming* » (Mikkelsen and Lindenberg, 2001),
- la troisième technique correspond à l'ajout d'hCG, dit « hCG *priming* », et permettrait d'induire la reprise de la méiose *in vivo* (Chian *et coll.*, 2000). La méthode d' « hCG *priming* » est la plus utilisée car elle permet d'augmenter significativement les taux de grossesses (Chang *et coll.*, 2014) (Figure 14).



Figure 14. Photo d'un ovocyte immature après aspiration (à gauche) ; photo d'un ovocyte mature après 24 heures de maturation *in vitro* (au centre) ; photo d'ovocytes après décoronisation suite à la maturation *in vitro* durant 24 heures (à droite) (Walls *et coll.*, 2015).

Les indications principales pour la MIV sont, les femmes à risque de syndrome d'hyperstimulation ovarienne, les femmes souffrant de syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), ainsi que celles dont le traitement hautement gonadotoxique ne peut être repoussé dans le temps, et enfin les petites filles prépubères (Chang *et coll.*, 2014; Xia *et coll.*, 2015).

Les premières naissances issues de MIV sans stimulation ovarienne après une assistance médicale à la procréation ont été reportées dans les années 90 (Cha *et coll.*, 1991; Trounson *et coll.*, 1994). Depuis, le nombre d'enfants issu de MIV est estimé à environ 2500, avec la majorité des naissances obtenue hors-contexte de cryopréservation. Cependant, de nombreuses données ne sont pas publiées ce qui rend les résultats difficiles à répertorier. Des analyses ont permis de montrer que l'incidence d'anomalies congénitales chez les enfants issus de MIV était comparable à celle des enfants issus des techniques conventionnelles avec stimulation ovarienne (Fadini *et coll.*, 2012).

5.2.5. La transposition ovarienne

La transposition ovarienne consiste à déplacer l'ovaire hors du champ d'exposition aux radiations ionisantes lorsqu'une radiothérapie pelvienne ou abdominale est programmée (Figure 15). La transposition ovarienne s'effectue chirurgicalement par laparotomie ou par cœlioscopie. L'ovaire est généralement déplacé latéralement à la paroi pelvienne, ou derrière l'utérus (Salama *et coll.*, 2016).

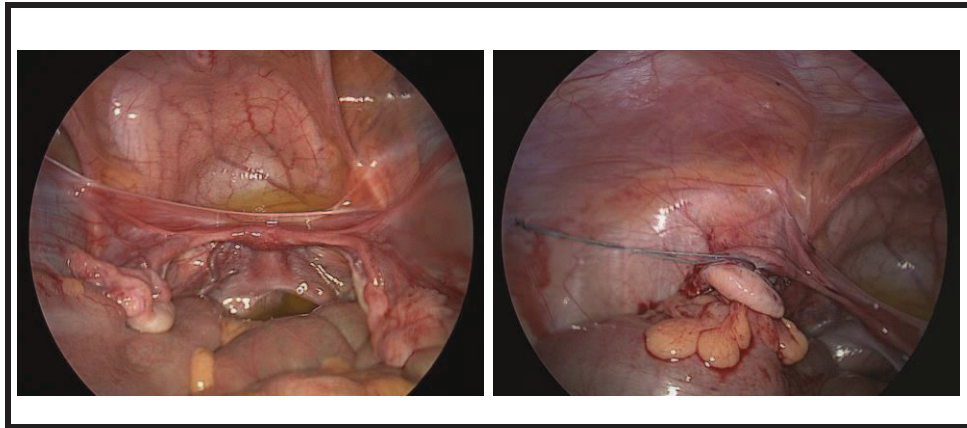


Figure 15. Vue cœlioscopique de la cavité pelvienne : A gauche, avant la transposition; A droite, l'ovaire gauche transposé par suture non-résorbable à la paroi de la cavité abdominale (D'après Irtan *et coll.* (146)).

La transposition ovarienne est souvent effectuée après l'administration d'une chimiothérapie afin de contrôler l'invasion tumorale. Les principales indications pour les femmes sont les cancers du rectum et du col de l'utérus. Pour les petites filles néanmoins, la transposition ovarienne devrait être envisagée pour toute pathologie impliquant la région pelvienne (Irtan *et coll.*, 2013).

La transposition ovarienne est considérée comme une technique simple et fiable (Gubbala *et coll.*, 2014). Le risque d'induire le développement de métastase au niveau de l'ovaire non-irradié peut amener à certaines interrogations sur cette technique (Han *et coll.*, 2011). Cependant, il semblerait que le pourcentage de cancer de l'ovaire soit très faible dans ce cas (Bisharah and Tulandi, 2003).

Le taux de réussite de la transposition ovarienne varie donc en fonction de l'âge de la patiente, de la dose et du site d'irradiation, ainsi que de l'administration ou non d'une chimiothérapie au préalable (Salama *et coll.*, 2016).

5.2.6. La protection hormonale : les analogues de la GnRH

Depuis une trentaine d'années, différentes études ont montré que l'utilisation d'analogues de la GnRH pourrait permettre de préserver la fertilité féminine avant l'administration d'un traitement gonadotoxique. L'administration d'analogues de la GnRH est simple et peu onéreuse. Contrairement à la congélation d'embryons, d'ovocytes et de tissu ovarien d'une part, ou à la transposition ovarienne d'autre part, cette approche ne nécessite ni stimulation ovarienne ni procédure chirurgicale (Turner *et coll.*, 2013).

Les mécanismes d'action des analogues de la GnRH restent inconnus, cependant plusieurs hypothèses ont été émises (Blumenfeld, 2007):

- L'utilisation d'analogues de la GnRH pourrait diminuer le nombre de follicules primordiaux entrant en stade de différenciation en inhibant l'expression d'hormones stéroïdes tels que l'œstradiol et l'inhibine ; les follicules en état d'activation étant plus vulnérables à la chimiothérapie (Figure 16).
- L'état hypoestrogénique due à cette inhibition diminuerait la perfusion ovarienne et donc la distribution de la chimiothérapie dans l'ovaire. Cependant, ceci pourrait avoir comme effet de diminuer l'efficacité de la chimiothérapie et donc avoir un impact sur la guérison même de la patiente.
- Les analogues de la GnRH pourraient agir sur la régulation de molécules anti-apoptotiques telle que la sphingosine-1-phosphate (S1P) et donc réduire l'atrésie folliculaire.
- Il a également été suggéré qu'ils pourraient avoir un effet protecteur sur les cellules souches germinales ovariennes, qui pourraient ainsi générer la production de follicules primordiaux *de novo* (Moreno *et coll.*, 2015).

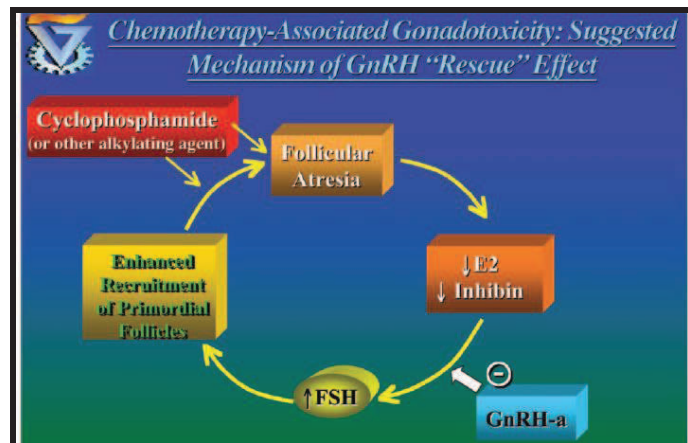


Figure 16. Schéma représentant un potentiel mécanisme d'action des analogues de la GnRH, via l'inhibition de l'œstradiol (E2) et de l'inhibine, ayant pour effet une diminution de la concentration en FSH et donc une diminution de l'atrésie des follicules primordiaux provoquée par la chimiothérapie (Blumenfeld, 2007).

Jusqu'à présent, 28 études cliniques consistant à évaluer l'effet de la co-administration d'analogues de la GnRH en parallèle à la chimiothérapie ont pu être répertoriées (Tableau 4). Parmi celles-ci, 20 études ont permis d'obtenir des résultats en faveur de l'utilisation d'analogues de la GnRH (Blumenfeld and Evron, 2015). En effet, dans 91 % des cas, les patientes co-traitées ont pu préserver leur fonction ovarienne, comparé à 41 % pour les groupes contrôle. Pour les patientes traitées, le taux de grossesse a été de 19 % (Blumenfeld and Evron, 2015).

Etudes en faveur de l'utilisation d'analogues de la GnRH pour la préservation de la fertilité féminine	Nombre de femmes ayant participé à l'étude	Etudes en défaveurs de l'utilisation d'analogues de la GnRH pour la préservation de la fertilité féminine	Nombre de femmes ayant participé à l'étude
(Ataya <i>et coll.</i> , 1995)		(Waxman <i>et coll.</i> , 1987)	17
(Blumenfeld <i>et coll.</i> , 2011)	42	(Azem <i>et coll.</i> , 2008)	17
(Pereyra Pacheco <i>et coll.</i> , 2001)	16	(Munster <i>et coll.</i> , 2012)	49
(Somers <i>et coll.</i> , 2005)	40	(Nitzschke <i>et coll.</i> , 2010)	20
(Recchia <i>et coll.</i> , 2006)	100	(Behringer <i>et coll.</i> , 2010)	19
(Del Mastro <i>et coll.</i> , 2006)	28	(Leonard <i>et coll.</i> , 2010)	227
(Castelo-Branco <i>et coll.</i> , 2007)	56	(Gerber <i>et coll.</i> , 2011)	60
(Giuseppe <i>et coll.</i> , 2007)	31	(Elgindy <i>et coll.</i> , 2013)	100
(Blumenfeld <i>et coll.</i> , 2008)	85		
(Falorio <i>et coll.</i> , 2008)	61		
(Imai <i>et coll.</i> , 2007)	NA		
(Huser <i>et coll.</i> , 2008)	117		
(Urruticoechea <i>et coll.</i> , 2008)	51		
(Badawy <i>et coll.</i> , 2009)	78		
(Sverrisdottir <i>et coll.</i> , 2009)	285		
(Del Mastro <i>et coll.</i> , 2011)	281		
(Behringer <i>et coll.</i> , 2012)	331		
(Wong <i>et coll.</i> , 2013)	125		
(Demeestere <i>et coll.</i> , 2013)	84		
(Moore <i>et coll.</i> , 2015)	227		
Total	2038	Total	509

Tableau 4. Tableau représentant les différentes études effectuées dont les résultats sont en faveur ou non de la co-administration d'analogues de la GnRH lors de la chimiothérapie, et le nombre de patientes incluses dans l'étude (D'après Blumenfeld and Evron (34)).

Les critères des études réalisées sont toutefois très hétérogènes; notamment, l'âge des patientes, les protocoles des chimiothérapies administrées, le suivi des patientes, les facteurs d'évaluation de la réserve ovarienne (AMH, FSH, inhibine) et de l'efficacité de la reprise ovarienne utilisés diffèrent d'une étude à l'autre (Bildik *et coll.*, 2015). Selon Oktay *et coll.*, la reprise des règles ne devrait pas être un élément suffisant en faveur de l'efficacité de l'administration des analogues de la GnRH. L'apparition d'une grossesse reste le plus précis des facteurs attestant de l'efficacité d'une thérapie de préservation de la fertilité féminine (Oktay *et coll.*, 2015).

Une récente étude au cours de laquelle des patientes souffrant de lymphomes ont été suivies pendant une période allant de deux à sept ans (contre un à trois ans de suivi pour les études précédentes (Blumenfeld and Evron, 2015)) a montré que l'administration d'analogues de la GnRH n'aurait pas d'effet significatif sur le taux de grossesse obtenu, qui a été de 53,1 % chez les patientes traitées avec des analogues de la GnRH contre 42,8 % chez les patientes « contrôles » (Demeestere *et coll.*, 2016).

De plus, l'utilisation d'analogues de la GnRH ne semble pas efficace lorsque la chimiothérapie envisagée est très agressive comme dans le cas de traitement conditionnant à la greffe de moelle osseuse. Dans le cas de radiothérapie, cette technique reste également sans effet (Blumenfeld, 2007).

5.2.7. Les agents protecteurs : la protection chimique

De nouvelles stratégies de préservation de la fertilité fondées sur l'utilisation de drogues en co-traitement de la chimio- ou radiothérapie sont en développement.

L'AS101 (ammonium trichloro (dioxo éthylène-0,0') tellurate) est un immunomodulateur dont l'implication dans la régulation de la voie PI3K/PTEN/Akt a été démontrée chez la souris. Une étude de Kalich-Philosoph *et coll.* a consisté à co-traiter des souris avec respectivement l'AS101 et le cyclophosphamide (Cy) par injection intra-péritonéale. Le Cy est un agent alkylant dont l'utilisation en chimiothérapie est établie chez les patientes atteintes de cancer. Dans un premier temps, cette étude a permis de montrer que le Cy induisait une perte en follicules ovariens par des flux d'activation des follicules dormants, qui une fois activés vont dégénérer du fait de l'effet apoptotique de la drogue (Kalich-Philosoph *et coll.*, 2013). Cependant, lorsque l'AS101 est injectée en parallèle du Cy, une réduction de l'apoptose et donc un maintien du nombre de follicules primordiaux a pu être observé (Figure 17).

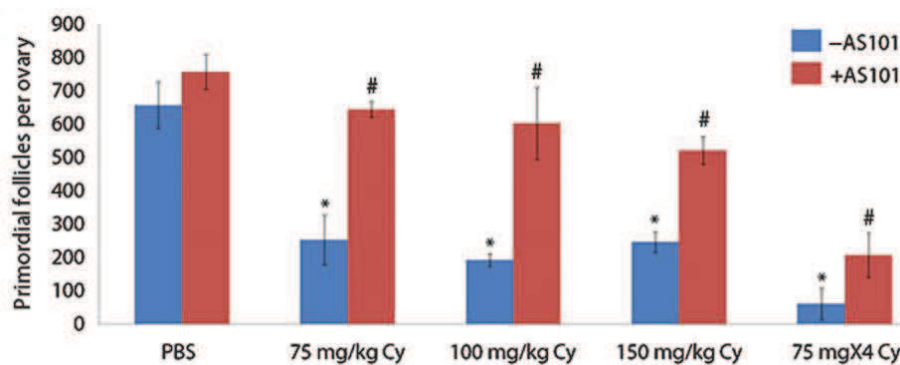


Figure 17. Variation du compte de follicules primordiaux au sein d'un ovaire de souris après 1 semaine de traitement avec des doses variables de cyclophosphamide, avec (en rouge) ou sans co-traitement à l'AS101 (en bleu) (Kalich-Philosoph *et coll.*, 2013).

Cette étude a dans un deuxième temps permis de montrer que l'action de l'AS101 permettrait de bloquer l'activation anormale des follicules primordiaux induite par le Cy. L'AS101 est actuellement testée en essais cliniques de phase 2 (Kalich-Philosoph *et coll.*, 2013) (Figure 18).

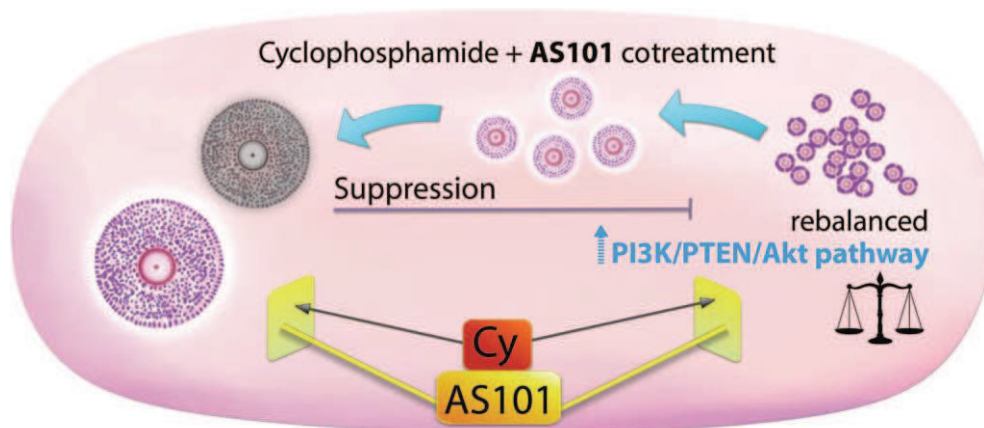


Figure 18. Schéma représentant l'effet d'AS101 sur la voie PI3K/PTEN/Akt lors du traitement d'un ovaire par le cyclophosphamide (Kalich-Philosoph *et coll.*, 2013).

La sphingosine-1-phosphate (S1P), qui agit également comme un agent anti-apoptotique, pourrait aussi être utilisé à des fins de préservation de la fertilité. Une étude de Li *et coll.*, dans laquelle des fragments de tissu ovarien ont été xéno greffés chez des souris ovariectomisées a eu pour but d'évaluer la capacité de la S1P à inhiber l'apoptose des follicules ovariens humains. La S1P a été administrée 24 heures avant l'administration de Cy, puis en continu 72 heures après la chimiothérapie (Figure 19).

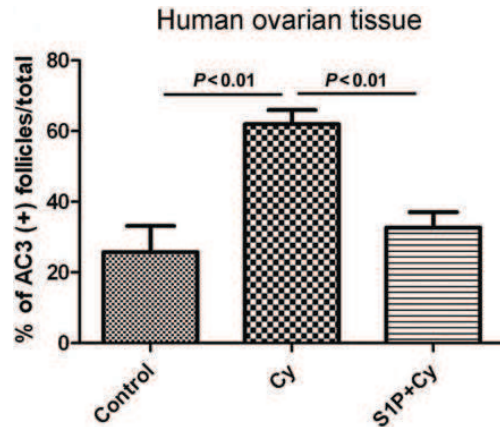


Figure 19. Pourcentage de follicules au sein d'un tissu ovarien humain exprimant la caspase 3 activée (AC3, un marqueur de l'activation de l'apoptose), après traitement au cyclophosphamide (Cy) avec ou sans sphingosine-1-phosphate (S1P), par rapport au contrôle (Li *et coll.*, 2014).

L'administration de S1P permettrait de diminuer l'apoptose des follicules ovariens présents au sein du greffon, cependant le processus par lequel se fait cette action reste à élucider (Li *et coll.*, 2014). De plus, l'administration de S1P, par injection directement au niveau de l'ovaire, implique que les patientes devraient subir une procédure plus invasive qu'avec l'administration d'AS101.

6. Le risque de réintroduire des cellules malignes après la greffe de cortex ovarien cryoconservé en cas de leucémies

6.1. Les leucémies

6.1.1. Définition

Les pathologies hématologiques représentent les indications majeures de cryopréservation de tissu ovarien, soit 37,5 %. Parmi celles-ci, les leucémies aigües lymphoïdes (LAL), les leucémies aigües myéloïdes (LAM) et les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) sont les pathologies les plus représentées chez les patientes jeunes, de moins de 20 ans (Dolmans *et coll.*, 2013). Les plus fréquentes chez les patientes pré-pubères sont les LAL qui représentent 75 % des cas de leucémies et les LAM avec 15 % des cas de leucémies (Ward *et coll.*, 2014).

Les traitements de choix en cas de leucémies consistent en une chimiothérapie comportant une phase d'induction avec ou sans intensification, suivie d'une phase de consolidation et enfin une phase de maintenance. Pour les patients à haut risque de rechute, la greffe de cellules hématopoïétiques peut également être envisagée (Chung and Ma, 2017).

Les leucémies sont dues à des altérations des mécanismes de renouvellement, de prolifération et de différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques. Les anomalies génétiques résultantes sont diagnostiquées par profilage cytogénétique (caryotype) et biologie moléculaire (« real time-quantitative polymerase chain reaction » ou RT-qPCR) (Chung and Ma, 2017).

6.1.2. Anomalies cytogénétiques et moléculaires associées aux LAM

Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes en cas de LAM sont les anomalies de translocations t(15;17) et les LAM-CBF ou « core binding factor », qui incluent également les translocations t(8;21), les t(16;16) et les inversions inv(16). Des mutations géniques sont également observées : la mutation du gène *NMP1* (*nucleophosmin-1*) observée dans 25 à 35 % des cas de LAM, du gène *FLT3* (*Fms-like tyrosine kinase*) dans 25 à 45 % des cas, du gène *CEBPA* (*CCAAT-enhancer binding protein A*) dans 4 à 9 % des cas et du *KIT* chez 2 à 8 % des patients (Chung and Ma, 2017).

6.1.3. Anomalies cytogénétiques et moléculaires associées aux LAL

Le chromosome de Philadelphia (*Ph*) résulte de la translocation t(9;22)(q34;q11) qui induit une fusion du gène *BCR-ABL1*. Cette anomalie est la plus fréquente chez l'adulte (25-33 %) contrairement à l'enfant (2-5 %). Les réarrangements du gène *MLL* (*mixed lineage leukemia*) localisé sur la bande chromosomique 11q23 représente 7 % des cas adultes, tandis que d'autres réarrangements tels que t(4;11)(q21;q23) sont observés chez 60 % des enfants âgés de moins d'un an. La translocation t(12;21)(p13;q22) codant pour le gène de fusion *ETV6-RUNX1* représente 20 à 25 % des cas chez les enfants atteints de LAL.

Les récentes avancées en génomique ont permis la découverte d'une mutation secondaire appelée LAL *Ph-like* ou *BCR-ABL1 like*, présente chez 10 à 15 % des enfants atteints.

Le profil d'expression génique de cette mutation est similaire à celui des LAL *BCR-ABL1* positives, mais de gravité plus importante en termes de diagnostic. Ces patients ont souvent une mutation du gène *IKZF1* qui code pour la protéine IKAROS, ou une dérégulation de l'expression du gène des récepteurs de cytokines *CRLF2*. La surexpression de *CRLF2* va induire une mutation de la voie de signalisation des JAK-STAT (notamment de *JAK2*) (Chung and Ma, 2017).

6.1.4. Immunophénotypages associés aux leucémies aigües

Des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes exprimés à la surface des cellules leucémiques sont utilisés pour le diagnostic des leucémies aigües. En effet, certains marqueurs spécifiques de la maladie ont été observés : le CD33 est exprimé sur les cellules leucémiques dans 85 % des cas de patients atteints de LAM, le CD19 est exprimé de manière ubiquitaire sur les cellules leucémiques en cas de LAL pour la lignée B, le CD20 est exprimé dans 30 à 50 % des cas de LAL pour la lignée B, le CD22 est exprimé dans plus de 90 % des cas de LAL pour la lignée B, et le CD52 est exprimé dans environ 60 % des nouveau cas diagnostiqué de LAL (Chung and Ma, 2017).

6.2. Les différentes techniques de détection de la maladie résiduelle

Malgré un taux de survie à 5 ans chez les jeunes patients souffrant de leucémie supérieur à 60 %, il a été constaté que chez des patients en rémission morphologique complète, jusqu'à 10^{10} cellules leucémiques résiduelles pouvaient encore être présentes dans la moelle osseuse. La maladie résiduelle en hématologie est de ce fait définie comme la présence de cellules leucémiques résiduelles non détectées par les méthodes d'observations morphologiques conventionnelles (Chung and Ma, 2017).

Meirow a été le premier à détecter des cellules leucémiques dans des fragments de tissu ovarien cryoconservés de patientes souffrant de LMC par RTq-PCR (Meirow *et coll.*, 2008). Depuis, la notion de risque de réintroduire des cellules malignes par greffe de tissu ovarien cryoconservé pour les pathologies métastatiques à localisation ovarienne a été établie.

Le risque de réintroduction de la maladie dépend du type de pathologie, de son stade, du nombre de cellules malignes potentiellement transférables, ainsi que de l'initiation ou non du traitement gonadotoxique avant la cryopréservation des fragments de cortex ovariens (Greve *et coll.*, 2012; Rosendahl *et coll.*, 2010).

6.2.1. Evaluation morphologique

Plusieurs techniques sont actuellement disponibles afin d'évaluer le niveau de maladie résiduelle au sein des fragments de tissu ovarien humain cryoconservés. L'histologie et l'immunohistochimie ont longtemps été utilisées à ces fins (Figure 20). Cependant, ces techniques sont qualitatives et peuvent engendrer de faux positifs ou faux négatifs (Rauff *et coll.*, 2016). En effet, plusieurs études ont permis d'observer que ces deux techniques ne permettaient pas de détecter la présence de cellules malignes tandis que des techniques de biologie moléculaire le permettaient lorsque celles-ci étaient associées (Dolmans *et coll.*, 2010; Kyono *et coll.*, 2010; Rosendahl *et coll.*, 2010).

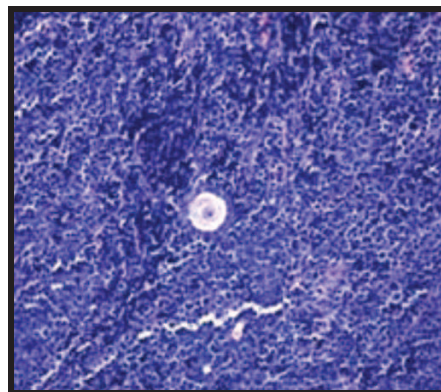


Figure 20. Coupe histologique de tissu ovarien après xénogreffe, sur laquelle un envahissement par des cellules malignes autour d'un follicule secondaire est clairement visible, après coloration à l'hématoxyline éosine (Dolmans *et coll.*, 2010).

6.2.2. La xénogreffe

La xénogreffe consiste à greffer des fragments de tissu ovarien cryoconservés issus de patientes à risque chez des souris immunodéprimées (Figure 21). Le but est de tester la capacité de ces fragments à induire une prolifération de cellules malignes chez l'hôte et donc de provoquer des signes physiologiques caractéristiques de la maladie. Cette technique est beaucoup plus sensible que les techniques histologiques classiques et reste la seule technique permettant d'évaluer le potentiel prolifératif des cellules cancéreuses *in vivo*. Cependant elle demande une longue période d'incubation (environ 6 mois) et les résultats obtenus ne sont pas toujours pertinents. En effet, l'apparition d'une maladie chez une patiente est un procédé long qui ne peut pas être transposable aux résultats obtenus chez la souris (Lotz *et coll.*, 2011; Meyer and Debatin, 2011).



Figure 21. Vue macroscopique de la procédure de xénogreffe de tissu ovarien humain, au niveau de la cavité péritonéale, sur une souris immunodéficente (Dolmans *et coll.*, 2010).

6.2.3. L'analyse moléculaire

La détection moléculaire par la technique de « Polymérase Chain Reaction » quantitative (qPCR) ou en temps réel (« Real Time quantitative-Polymérase Chain Reaction », RT-qPCR) est utilisée afin d'évaluer le niveau de maladie résiduelle sur des échantillons de sang et de moelle osseuse au moment du diagnostic. Cette technique repose sur l'amplification des réarrangements des gènes codant pour les chaînes des immunoglobulines IgH, des récepteurs des cellules T (ou TCR) ainsi que des transcrits de gènes de fusion.

En utilisant les mêmes marqueurs, il a été possible de détecter des cellules leucémiques présentes au sein de fragments de tissu ovarien cryoconservés. Le transcript BCR-ABL1 (Breakpoint Cluster Region/proto-oncogène tyrosine kinase ABL1), est fréquemment utilisés afin d'identifier la présence de cellules leucémiques par RTq-PCR (Amiot *et coll.*, 2013; Dolmans *et coll.*, 2013; Donnez and Dolmans, 2013; Jahnukainen *et coll.*, 2013). Les techniques de biologie moléculaire sont très sensibles, avec un seuil de détection de 10^{-4} (van der Velden *et coll.*, 2003). Néanmoins, cette forte sensibilité implique que certains matériels génétiques provenant de cellules non viables puissent également être détectés, ce qui engendre des résultats faussement positifs (Bastings *et coll.*, 2013). De plus, les marqueurs moléculaires nécessaires à ces techniques de détection ne sont pas toujours disponibles, ce qui rend les fragments en question inexploitable pour la détection de la maladie résiduelle dans le cortex ovarien (Donnez *et coll.*, 2013).

6.2.4. La cytométrie en flux multicolore (CFM)

La CFM repose sur l'identification d'immunophénotypes exprimés à la surface des cellules leucémiques, mais absents des cellules hématopoïétiques et ovariennes saines (Campana and Coustan-Smith, 1999). Ces immunophénotypes associés à la leucémie (ou « leukemia associated immunophenotype », LAIP) peuvent ensuite être identifiés à l'aide de technique d'immunomarquages avec des anticorps conjugués à différents fluorochromes. Afin d'évaluer le risque de maladie résiduelle par CFM, il est important d'obtenir au préalable le LAIP de la patiente au moment du diagnostic, l'absence de LAIP restant rare.

L'évaluation du risque de maladie résiduelle par CFM chez les patientes est influencée par le nombre de marqueurs identifiés au diagnostic. Il est donc important d'inclure une combinaison de marqueurs différents, non-exprimés ou très peu exprimés à la surface des cellules ovariennes, afin d'affiner les résultats et donc améliorer l'analyse (Ommen, 2016; Theunissen *et coll.*, 2017; Zver *et coll.*, 2014).

La sensibilité et la reproductibilité de la CFM sont proportionnelles au nombre de cellules qui seront analysées. Cependant dans le cas des leucémies, le nombre de cellules analysables est souvent faible et varie d'une patiente à l'autre, ainsi que d'un fragment de cortex ovarien à un autre (Campana and Coustan-Smith, 1999).

La sensibilité de la CFM par rapport au diagnostic dans le sang et la moelle osseuse est établi à 10^{-4} soit 20 évènements de phénotypes anormaux parmi 200000 cellules viables analysées (Amiot *et coll.*, 2013; Zver *et coll.*, 2014; Zver *et coll.*, 2015).

Le seuil de détection minimal de la maladie résiduelle a été défini à 20 évènements anormaux détectés, au-delà de ce seuil le fragment analysé sera considéré comme positif (Campana and Coustan-Smith, 1999; Dworzak *et coll.*, 2008). Cependant, le nombre de cellules nécessaires pour induire une reprise de la maladie post-greffe restant inconnu, l'autotransplantation de fragments de tissu ovarien cryoconservés n'est pas recommandée dans le cas de leucémies (Amiot *et coll.*, 2013; Bastings *et coll.*, 2013; Rosendahl *et coll.*, 2013).

Lorsque des marqueurs moléculaires ne sont pas disponibles pour effectuer une analyse par RTq-PCR, la CFM est la seule technique envisageable. Dans le cas de LAM et LAL, il a pu être démontré qu'il y a une corrélation entre les résultats obtenus par CFM et par RTq-PCR dans un modèle expérimental d'ajout de cellules leucémiques (Amiot *et coll.*, 2013) (Figure 22).

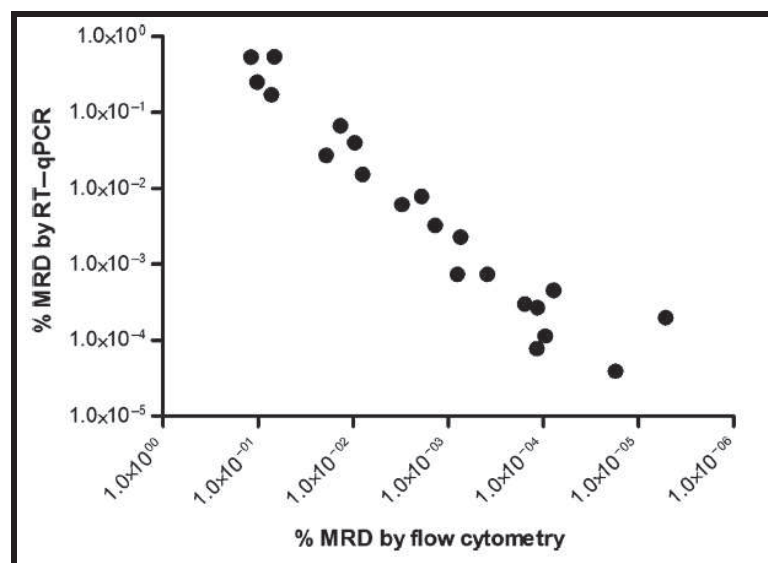


Figure 22. Corrélation entre le niveau de maladie résiduelle mesuré (en pourcentage) par RTq-PCR et par CFM (Amiot *et coll.*, 2013).

Notre équipe de recherche est la première à avoir effectué l'analyse de la maladie résiduelle à partir de la dissociation de fragments de tissu ovarien cryoconservés de patientes atteintes de leucémie par CFM. Jusqu'à maintenant, 13 patientes ont pu être testées par CFM dont 8 patientes atteintes de LAL et 5 de LAM.

Parmi celles-ci, 4 ont été positives, soit 30 % des patientes analysées. Les marqueurs moléculaires n'étant que peu disponibles, les fragments de tissu ovarien dissociés de seulement 2 patientes ont pu être testé par PCR, ces fragments de tissu ovarien analysés étaient négatives après analyse par PCR comme par CFM (Zver *et coll.*, 2014; Zver *et coll.*, 2015).

De par le nombre important de marqueurs de surface disponibles, la CFM pourrait potentiellement être applicable à toutes les patientes atteintes de leucémies, ce qui n'est pas le cas de la PCR. La possibilité de pouvoir combiner différentes techniques de détection de la maladie résiduelle (PCR, CFM, xénogreffes) serait la solution idéale afin d'évaluer et de maîtriser le risque carcinologique des patientes avant d'envisager une greffe de fragments de tissu ovarien cryoconservés (Amiot *et coll.*, 2013).

6.3. Le risque de maladie résiduelle

Dans le cas des leucémies, l'administration de traitements gonadotoxiques est le plus souvent initiée avant que des techniques de préservation de la fertilité ne soient proposées aux patientes du fait de l'urgence de leur prise en charge. Cependant, il a été prouvé qu'un cycle de chimiothérapie n'était pas suffisant pour éradiquer toutes les cellules malignes présentes dans le tissu ovarien (Dolmans *et coll.*, 2010). Même chez des patientes en rémission, plusieurs études avec analyse par PCR, ont montré que des cellules malignes étaient toujours présentes (Greve *et coll.*, 2012; Jahnukainen *et coll.*, 2013). En d'autres termes, même si le risque de trouver des cellules leucémiques dans des fragments de tissu ovarien cryoconservés de patientes en rémission est faible, il ne peut pas être totalement exclu (Suzuki and Donnez, 2016).

Des expériences de xénogreffes chez la souris ont démontré que la greffe de tissu ovarien cryoconservé de patientes positives pour la maladie résiduelle pouvait induire l'apparition de masses tumorales à 6 mois d'incubation des greffons (Dolmans *et coll.*, 2010). Des expériences de xénogreffes de cellules leucémiques encapsulées dans un gel de fibrine ont été effectuées par Soares *et coll.* Contrairement aux expériences précédemment réalisées, l'étude de Soares *et coll.* a permis d'évaluer l'apparition de tumeurs après la greffe d'un ovaire artificiel contenant un nombre précis de cellules leucémiques. Cette étude a montré qu'un nombre très important de cellules leucémiques était nécessaire à l'apparition de signe caractéristique de la maladie chez la souris.

En effet, seul le contrôle positif, qui a consisté en la greffe d'un gel contenant 3 millions de cellules leucémiques chez des souris, a permis d'observer l'apparition d'une masse tumorale au niveau péritonéal. Tandis que des valeurs plus faibles (10 et 100 cellules leucémiques) ne permettaient pas d'observer des signes d'apparition d'une masse tumorale (Soares *et coll.*, 2015c).

Les résultats obtenus par xénogreffes dépendant de l'espèce utilisée et du site de greffe, le nombre de cellules nécessaires pour induire une leucémie est donc difficilement transposable à l'homme. Dans les années 50, des expériences consistant à injecter des cellules malignes chez des prisonniers n'ont pas permis d'aboutir à une néoplasie (Lanman *et coll.*, 1950). Ces expériences, qui posent un problème éthique, ne seraient évidemment pas envisageables de nos jours. Chez l'homme, le nombre de cellules leucémiques nécessaires pour induire une rechute reste donc inconnu.

Le taux de rechute des patientes après autotransplantation de tissu ovarien, toutes pathologies confondues, a été récemment évalué à 7 % (3 patientes sur 41 patientes greffées). Cependant aucune cellule maligne n'a été retrouvée au niveau du site de transplantation. Des cellules malignes ont été retrouvées au niveau du sein et de l'hémithorax des patientes. L'absence de cellules malignes au niveau du site de greffe remet en question l'implication de celles-ci dans la reprise de la maladie (Jensen *et coll.*, 2015; Rosendahl *et coll.*, 2013).

Malgré le fait que des fragments de tissu ovarien soient analysés afin d'évaluer le risque de maladie résiduelle, cela ne permet pas d'exclure que les fragments qui seront greffés par la suite soient dépourvu de cellules malignes, sachant que ceux-ci ne peuvent être analysés. L'étude de Meirow a été la première relatant une grossesse chez une patiente ayant précédemment été atteinte d'une leucémie après greffe de tissu ovarien cryopréservé (Meirow *et coll.*, 2016). Seules deux études au cours desquelles des patientes leucémiques ont pu être regreffées ont été répertoriées pour l'instant : l'étude de Meirow *et coll.*, avec une patiente présentant une LMC et une ayant une LAM, ainsi que l'étude de Silber *et coll.*, avec une patiente présentant une LAL. Aucune rechute n'a été observée dans les trois cas de greffe (Meirow *et coll.*, 2016; Silber *et coll.*, 2015).

La première naissance, suite à ces greffes, a été reportée par Shapira *et coll.*, et concerne la patiente ayant eu une LAM (Shapira *et coll.*, 2018). Cette patiente était déjà en rémission lors de la cryopréservation de ces fragments de tissu ovarien. La présence de cellules leucémiques résiduelles au sein de fragments de tissu ovarien de cette patiente a été évaluée par histologie, immunohistochimie, séquençage, hybridation *in situ* à fluorescence et xénogreffe chez la souris. Ces tests ont tous permis de conclure sur l'absence de cellules leucémiques.

Cette patiente a pu donner naissance à un bébé en bonne santé après avoir eu recours à une procédure de fécondation *in vitro* (Shapira *et coll.*, 2018).

La cryopréservation de fragments de cortex ovarien doit tout de même être proposée aux patientes dont le risque de réintroduire des cellules cancéreuses est important (tel que dans le cas des leucémies), en fonction de l'âge, dans l'optique où de futures alternatives basées sur l'utilisation de follicules ovariens isolés puissent un jour être applicables à toutes les patientes (Benard *et coll.*, 2016).

6.4. La purification cellulaire en vue d'éliminer les cellules malignes

Pour les pathologies à risque de réintroduction de cellules malignes, la purification cellulaire a été envisagée dans le but d'éliminer les cellules cancéreuses potentiellement présentes. Cette technique nécessite au préalable une dissociation du tissu ovarien afin d'obtenir une suspension cellulaire analysable. Peu de techniques sont décrites dans la littérature afin d'éradiquer des cellules malignes dans le cas du tissu ovarien.

Parmi les différentes méthodes de tri cellulaire, le FACS (« *Fluorescence Activated Cell Sorting* ») est la méthode la plus connue. Cette technique repose sur l'utilisation d'anticorps couplés à un fluorochrome dirigés contre des antigènes de surface des cellules d'intérêts, permettant ainsi leur séparation physique. Le FACS a été utilisé avec succès pour séparer des cellules cancéreuses dans des suspensions testiculaires humaines contaminées (Dovey *et coll.*, 2013). Cette technique permet de maintenir la viabilité des cellules en suspension présentes dans la solution à analyser tandis que les cellules à éliminer seront prélevées. Le FACS reste toutefois peu rapide en raison des contraintes physiques, ce qui dans le cas de suspensions ovariennes, pourrait induire une perte folliculaire ainsi qu'une diminution de la viabilité folliculaire (Soares *et coll.*, 2015a). De plus, cette technique nécessite un nombre important de cellules analysables, ce qui n'est pas toujours le cas après dissociation du tissu ovarien humain (Dovey *et coll.*, 2013).

L'utilisation d'un anticorps bi-spécifique (BIS-1) a été évaluée afin de purger des suspensions ovariennes contenant des follicules isolés issues de la dissociation de fragments de tissu ovarien humain. Contrairement aux anticorps classiques, les anticorps bi-spécifiques combinent à la fois une affinité avec la cellule cible à trier et avec un effecteur cellulaire cytotoxique, ce qui permet une lyse des cellules à éliminer de manière plus efficace qu'avec un anticorps monoclonal.

Cependant le procédé de fabrication d'un anticorps bi-spécifique reste long et onéreux, aussi la technique d'application est encore une fois assez longue (Schroder *et coll.*, 2004).

La possible agrégation des cellules cancéreuses aux follicules ovariens peut également diminuer l'efficacité des deux techniques présentées. Une technique plus manuelle pourrait permettre d'optimiser la purification de cellules leucémiques. L'équipe de Soares *et coll.* a développé une technique consistant à pipeter les follicules ovariens, puis à les laver en effectuant trois transferts successifs dans du milieu de culture. Ils ont effectué une modélisation d'un ovaire contaminé en ajoutant des cellules leucémiques au sein de suspensions ovariennes saines. Après ces trois lavages, ils ont montré qu'aucune suspension ne contenait de cellules leucémiques après analyse par RTq-PCR (Soares *et coll.*, 2015a). Après avoir validé leur technique de purification, ils l'ont testé sur des fragments de tissu ovarien cryoconservés de patientes ayant eu une leucémie. Sur 12 patientes, 9 ont pu être testé par RTq-PCR après dissociation et lavages par pipetages. Là encore, ils ont pu isoler plus de 2000 follicules et éliminer les cellules leucémiques présentes au sein des suspensions folliculaires obtenues (Soares *et coll.*, 2017). La durée de l'isolement et des lavages des follicules ovariens n'a pas excédé 75 minutes, et leur viabilité est restée bonne. Cette technique serait plus appropriée pour une utilisation clinique, toutefois l'analyse par RTq-PCR reste limitée lorsque les marqueurs moléculaires ne sont pas disponibles, comme cela fût le cas pour 3 patientes dans leur étude (Soares *et coll.*, 2017).

7. Les techniques alternatives à la greffe de tissu ovarien humain cryoconservé

7.1. La culture *in vitro* de tissu ovarien

La culture de cellules ou de tissu humain peut être fastidieuse, et le choix du système approprié nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres dont : la composition du milieu de culture, l'ajout de sérum, d'hormones, de protéines, de facteurs de croissance, l'apport en oxygène, la température, l'utilisation d'un support matriciel ou « scaffold », la durée de la culture, la culture de plusieurs types cellulaires ou « co-culture » (Smitz and Cortvrindt, 2002).

La culture de follicules ovariens a été réalisée dans de nombreuses espèces, notamment la culture de follicules primordiaux jusqu'au stade antral a déjà été réalisée chez la souris, et a permis la naissance de souriceaux (Eppig, 1994).

Cependant la transposition de cette technique chez l'homme est plus complexe du fait d'une taille des follicules plus importante et du temps nécessaire pour obtenir une folliculogénèse complète entre 5,5 à 6 mois selon Gougeon (125).

A ce jour, les techniques de culture *in vitro* actuelles ne sont pas considérées comme des méthodes pouvant être appliquées en thérapie afin de réutiliser les fragments de cortex ovarien cryoconservé (Guzel and Oktem, 2017).

Il a été suggéré que l'exposition prolongée aux conditions de culture *in vitro* pouvait augmenter le risque de changements épigénétiques au niveau du génome ovocytaire. Aucune étude n'a permis de prouver que cette hypothèse était avérée chez l'Homme. Des études effectuées sur des modèles murins ont toutefois montré qu'il n'y avait pas de différence entre les ovocytes issus de la culture *in vitro* de follicules secondaires et ceux issus d'une croissance *in vivo* sans stimulation préalable (Anckaert *et coll.*, 2013).

7.1.1. La culture de fragments de cortex ovarien humain

Cette technique consiste à mettre en culture des fragments de cortex ovariens frais ou décongelés, afin de recréer la croissance folliculaire dans l'environnement dans lequel la folliculogénèse a lieu *in vivo*.

Plusieurs expériences ont pu montrer que la culture de fragments de cortex ovarien dans des boîtes de culture permettait la survie, la différenciation et la croissance des follicules primordiaux, primaires et secondaires (Khosravi *et coll.*, 2013; Laronda *et coll.*, 2014) (Figure 23). Dans certains cas, le tissu lui-même est encapsulé dans une matrice servant de support rigide avant la culture (Laronda *et coll.*, 2014) ou cultivé dans une boîte de culture dont le fond est recouvert de matrigel® (Hovatta *et coll.*, 1997).

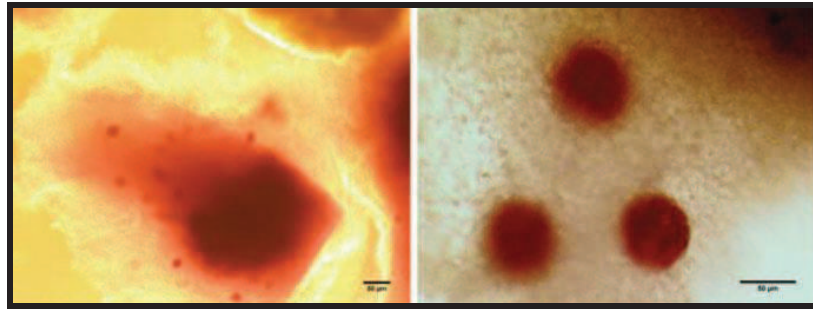


Figure 23. Photos d'un fragment de tissu ovarien contenant des follicules ovariens humains colorés au rouge neutre après 7 jours de culture *in vitro*. Barre d'échelle = 50 μ m (Khosravi *et coll.*, 2013).

La culture de fragments de cortex ovarien humain a cependant des limites : il y a une forte hétérogénéité entre les fragments de cortex ovarien humain. En effet, les différences dues à l'âge, aux antécédents médicaux et aux expositions environnementales propres à chacune peuvent avoir un impact sur la qualité et la composition des fragments (Laronda *et coll.*, 2014). De plus, il a été prouvé que pour les patientes de plus de 30 ans, les follicules avaient tendance à se grouper en clusters au sein du tissu probablement du fait d'une diminution du volume ovarien, et que le nombre de follicules, souvent imprévisible et inférieur par rapport aux patientes plus jeunes, n'était pas appropriée à l'évaluation de conditions de culture optimale (Cortvrindt and Smitz, 2001; Smitz and Cortvrindt, 2002).

Il semblerait que les follicules pré-antraux et antraux ne survivent pas en culture prolongée *in vitro* au sein du cortex ovarien frais. L'hypothèse émise serait que, dans ces conditions de culture, les follicules déclencheraient des signaux d'inhibition et empêcheraient donc par la même occasion le développement des follicules en croissance (primordiaux, primaires, secondaires), résultant en la perte de l'intégrité ovocytaire et leur mort (Hovatta *et coll.*, 1999; Telfer *et coll.*, 2008).

Afin de permettre la croissance des follicules au-delà du stade secondaire, ils doivent être cultivés de manière isolée, pour limiter les interactions négatives pouvant avoir lieu entre les follicules (Telfer *et coll.*, 2008).

7.1.2. La culture partielle

La culture partielle correspond à la culture de groupes ou « clusters » folliculaire, composés de fragments de cortex ovarien partiellement dissociés mécaniquement. Ceci permet de conserver le stroma qui entoure les follicules, afin de maintenir les interactions cellules stromales-follicules et follicules-follicules (Figure 24).

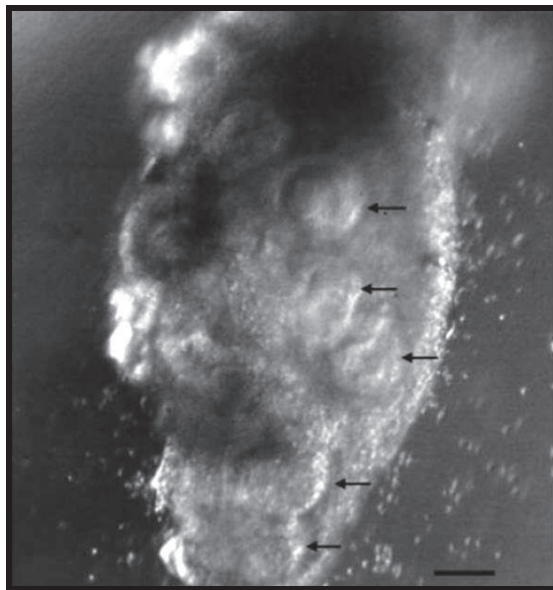


Figure 24. Photo d'un « cluster » de follicules issus de la dissociation partielle de tissu ovarien humain. Les flèches indiquent les follicules présents au sein du « cluster » ; barre d'échelle = 240 μ m (Hovatta *et coll.*, 1999).

Des expériences ont montré que la culture partielle permettrait d'obtenir une meilleure survie folliculaire que la culture *in vitro* de follicules isolés (Hovatta *et coll.*, 1999).

Cependant cette technique, tout comme la culture au sein d'un tissu, n'empêche pas le risque de réintroduire des cellules cancéreuses chez les patientes, étant donné que les cellules malignes peuvent toujours être emprisonnées au sein du stroma ovarien restant.

7.2. La culture *in vitro* de follicules ovariens humains isolés

7.2.1. L'isolement des follicules ovariens

L'isolement de follicules ovariens permettrait d'éviter le risque de réintroduire des cellules malignes chez les patientes. La lame basale, qui entoure les cellules de la granulosa constituant les follicules, permet de les protéger et d'exclure les cellules provenant du sang potentiellement contaminé (Rodgers *et coll.*, 2003). L'isolement des follicules ovariens peut être compliqué car les connexions entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui l'entourent sont moins denses et donc fragiles. De plus, le nombre de follicules obtenus après isolement est hétérogène, car leur distribution peut varier entre deux fragments d'un même ovaire, entre les deux ovaires d'une même femme; ceci est encore plus vrai pour les patientes plus âgées (Laronda *et coll.*, 2014).

L'isolement des follicules ovariens peut être effectué de manière mécanique ou enzymatique, ou encore en combinant les deux (Figure 25).

La dissociation mécanique se fait sur des fragments de cortex ovarien de petite taille (souvent inférieur à 500 μm), à l'aide d'une fine aiguille ou d'un scalpel, sous un microscope inversé. Cette technique est moins dommageable, ce qui permet de préserver l'intégrité du follicule ovarien et de maintenir la lame basale ainsi que la thèque autour des follicules (Telfer and Zelinski, 2013). Cependant, elle est difficile et chronophage, du fait de la forte densité du tissu fibreux de la corticale ovarienne humaine (Smits and Cortvrindt, 2002).

Différents types de collagénases ont été utilisés pour la dissociation enzymatique de fragments de cortex ovarien, telles que les collagénases de type Ia, II ou IV. Ces enzymes peuvent être utilisées seules, en combinaison avec une DNase ou une protéase, ou en combinaison avec une dissociation mécanique. Cependant, les collagénases sont naturellement produites par une bactérie appelée *Clostridium Histolyticum* et peuvent contenir un niveau très élevé d'endotoxines, qui peuvent altérer la structure folliculaire. Il a été décrit qu'un nombre important d'ovocytes extrudés pouvait être observés (Hovatta *et coll.*, 1999), ainsi que des altérations de la lame basale après isolement avec une collagénase non purifiée (Eppig, 1994). De plus, des variations peuvent être observées entre les lots des collagénases produites, ce qui peut engendrer des différences en termes d'efficacité de la dissociation tissulaire (Dolmans *et coll.*, 2006).

Des études visant à comparer l'effet de la dissociation mécanique et enzymatique à l'aide de collagénases ont permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence significative en termes de morphologie folliculaire après utilisation de ces deux techniques. Cependant, le nombre de follicules isolés est supérieur avec la dissociation enzymatique et la survie des follicules primordiaux semble être meilleure (Dong *et coll.*, 2014; Leghari *et coll.*, 2015).

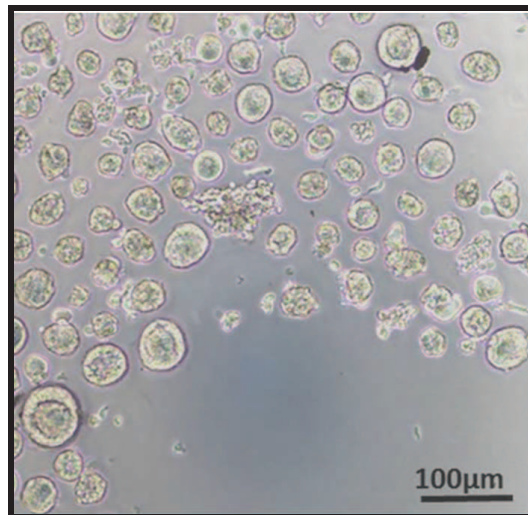


Figure 25. Follicules isolés obtenus à partir de la dissociation enzymatique et mécanique de tissu ovarien humains (D'après Chiti *et coll.* (54)).

De nouvelles enzymes hautement purifiées sont de plus en plus utilisées à la place des collagénases classiques afin d'augmenter la qualité des cellules isolées. La libérase correspond à un mélange de collagénases de type I et II hautement purifiées, et elle est utilisée pour l'isolement des îlots pancréatiques humains depuis plus de 20 ans (Linetsky *et coll.*, 1997). La libérase blendzyme 3 correspond à la première génération de libérase utilisée en recherche, elle n'est plus produite à ce jour (Hornick *et coll.*, 2012; Vanacker *et coll.*, 2011). Parmi les libérases de deuxième génération, on peut distinguer la libérase TM (« Medium Thermolysin » concentration) et la libérase DH (« High Dispase » concentration). La libérase TM est composée de la thermolysine, une protéase neutre thermostable, qui permet de dissocier la matrice extracellulaire (MEC) des tissus. La libérase DH contient quant à elle de la dispase, une protéase neutre, qui va cliver spécifiquement la fibronectine et le collagène IV qui sont présents dans la MEC des tissus (Lierman *et coll.*, 2015).

Il a été démontré que la dissociation de fragments de cortex ovarien était incomplète après utilisation de la libérase TM (Kristensen *et coll.*, 2011), tout comme ce fût le cas auparavant pour la libérase Blendzyme 3 (Dolmans *et coll.*, 2006). Le nombre de follicules isolés est de ce fait inférieur à celui obtenu avec une collagénase classique, et la plupart des follicules isolés sont toujours entourés par du stroma (Dolmans *et coll.*, 2006; Kristensen *et coll.*, 2011). Ceci peut être dû au fait que les libérases sont composées uniquement de deux collagénases (collagénases de type I et II) tandis que les collagénases classiques peuvent en contenir jusqu'à une trentaine (Dolmans *et coll.*, 2006).

L'utilisation de la libérase DH est donc recommandée pour la dissociation de tissu très fibreux, comme c'est le cas pour le tissu ovarien humain (Vanacker *et coll.*, 2011). En 2015, une étude a été effectuée afin de comparer la libérase DH, la libérase TM et la collagénase de type IV (Lierman *et coll.*, 2015). Selon cette étude, le nombre d'ovocytes extrudés ou de forme atypique a été supérieur avec la libérase TM et la collagénase de type IV, tandis qu'un nombre moindre de fragmentations de l'ADN a été observé avec la libérase DH. Il a été conclu que la libérase DH permettait d'isoler un nombre significativement plus important de follicules primordiaux, primaires et secondaires humains vivants et non endommagés (Lierman *et coll.*, 2015).

Des collagénases produites selon les bonnes pratiques de fabrication (« BPF » ou « GMP » pour « Good Manufacturing Practices ») des médicaments à usage humain et des médicaments expérimentaux à usage humain, sont actuellement disponibles sur le marché. La certification GMP implique le respect des directives européennes afin d'assurer la sécurité des produits utilisables chez l'Homme. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les bonnes pratiques de fabrication correspondent à « un élément de l'assurance de la qualité, garantissant que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché ».

Contrairement aux collagénases classiques, les collagénases de grade GMP peuvent être utilisées pour des applications cliniques et sont dépourvues d'endotoxines bactériennes. Il existe deux types de collagénase qui portent le grade GMP en France : les collagénases NB1 et les collagénases NB6, produites par les laboratoires SERVA®.

L'utilisation de la collagénase NB1 a été autorisée en France par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé pour l'isolement des îlots de Langerhans en vue de leur transplantation chez l'Homme (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), 2014).

Plusieurs études ont comparé l'efficacité de la collagénase NB1 et de la libérase pour la dissociation du tissu pancréatique. Ces études ont montré que la qualité des îlots de Langerhans isolés avec la collagénase NB1 était supérieure à celle de la libérase, avec moins de mort cellulaire et une meilleure morphologie des îlots (Brandhorst *et coll.*, 2010; Bucher *et coll.*, 2004). La collagénase NB6 a également montré son efficacité dans l'isolement de cellules stromales mésenchymateuses à partir de tissu de cordon ombilical humain (Fazzina *et coll.*, 2015). La collagénase NB1 reste pour l'instant la collagénase la plus pure et préconisée pour une application clinique en France. L'utilisation des collagénases NB1 et NB6 de grade GMP n'a pas encore été validée pour la dissociation de fragments de cortex ovarien humain, cependant cette validation serait une étape cruciale avant d'envisager l'utilisation de follicules isolés comme alternative à la greffe de tissu ovarien humain cryoconservé (Tableau 5).

Enzyme	Activité enzymatique	Composition	Niveau d'endotoxines	Conditionnement	Variations entre lots	Taux de survie des follicules isolés	Application clinique
Collagénase IA	≥ 125 CDU/mg solide	Jusqu'à 30 enzymes	Elevé	Poudre	Elevé	> 90 %	Non
Libérase DH	13 Wunsch U/ml liquide	Collagenase I, II et Neutral protease Dispase	< 50 EU/mg	Poudre	Nul	> 90 %	Oui
Collagénase NB6	≥ 0,1 U/mg lyophilisé	Collagenase I et II	NC	Poudre	Faible	NC	Oui
Collagenase NB1	≥ 3 U/mg lyophilisé	Collagenase I et II	≤ 10 EU/mg	Poudre	Faible	NC	Oui

Tableau 5. Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des différentes enzymes disponibles pour la dissociation de follicules ovariens isolés humains; NC : non connu (d'après les données des fournisseurs).

7.2.2. La culture bidimensionnelle ou culture 2D

La culture 2D consiste à placer un ou plusieurs follicules isolés dans une boîte multi-puits contenant un milieu de culture dont la composition est préalablement établie, sous huile.

Des expériences visant à cultiver des follicules pré-antraux isolés ont été réalisées chez l'Homme (Abir *et coll.*, 1997).

La culture de follicules primordiaux isolés est avantageuse, car ces follicules représentent plus de 90 % de la réserve ovarienne chez l'Homme, et ils résistent aux processus de congélation du fait de l'absence de liquide antral (McCaffery *et coll.*, 2000; Smitz and Cortvrindt, 2002). La culture 2D a permis aux follicules primaires et primordiaux humains de croître et passer au stade suivant dans un milieu de culture approprié, cependant la survie à long terme reste plus difficile pour les follicules de petite taille. Les follicules ont tendance à adhérer au support dans lequel est effectuée la culture 2D, ce qui peut causer une déformation des follicules et donc engendrer par la suite une altération de la membrane basale (Figure 26). Ceci peut causer le détachement des cellules de la granulosa, et notamment une extrusion ovocytaire. Les modifications structurales observées lors d'une culture 2D résultent d'un asynchronisme de développement et de maturation entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa avec lesquelles la communication a été altérée (Guzel and Oktem, 2017).



Figure 26. Photo d'un follicule secondaire de souris isolé mis en culture dans une boîte de pétri (à gauche) ; Photo d'un follicule secondaire de souris isolé après 2 jours de culture, où l'on peut observer des adhérences au niveau des cellules de la thèque ainsi que des cellules stromales en prolifération (à droite) (Smitz and Cortvrindt, 2002).

7.2.3. La culture tridimensionnelle ou culture 3D

Le but de cette technique est de cultiver des follicules isolés sur un support 3D ou encapsulés au sein d'un biomatériau ou « scaffold », d'origine naturelle qui mimerait le rôle de la matrice extracellulaire *in vivo*.

Ce biomatériau sert de support afin de maintenir la structure tridimensionnelle des follicules isolés et les interactions entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa.

Le matrigel® a d'abord été utilisé car il permettait de promouvoir la croissance et l'intégrité des follicules. Le matrigel® est une matrice composée d'un assortiment de protéines de la MEC extraites de tumeurs issues de lignées cellulaires de sarcome de souris. Cependant, malgré son efficacité, le matrigel® ne pourrait pas être utilisé en clinique du fait de sa provenance et de la grande variabilité en proportion des protéines qui le composent en fonction des lots (Guzel and Oktem, 2017). Aussi il a été démontré qu'un nombre moins important de follicules en croissance était retrouvé après culture *in vitro* dans un matrigel®, en comparaison à une matrice à base d'alginate (Kedem *et coll.*, 2011).

Le choix de la concentration et de la composition du « scaffold » est importante, et peut faciliter l'apport en oxygène ainsi que les échanges entre les follicules et les facteurs de croissance, nutriments ou hormones présents dans le milieu de culture (Smitz and Cortvrindt, 2002).

L'alginate est fréquemment utilisé pour la culture des follicules isolés. L'alginate correspond à une famille de polysaccharides produits par les algues brunes ou les bactéries. L'alginate a la capacité de former un hydrogel stable lorsqu'il est mis en présence de calcium ou de cations divalents (barium, strontium...) (Vanacker and Amorim, 2017). Contrairement à la fibrine ou au collagène, l'alginate est plus rigide ce qui permettrait un meilleur support et donc d'éviter la dissociation du follicule. La culture de follicules primordiaux et primaires encapsulés dans des billes d'alginate a permis leur survie d'environ 90 % au-delà d'une semaine et leur croissance de l'ordre de 10-20 μm (Amorim *et coll.*, 2009; Camboni *et coll.*, 2013) (Figure 27).

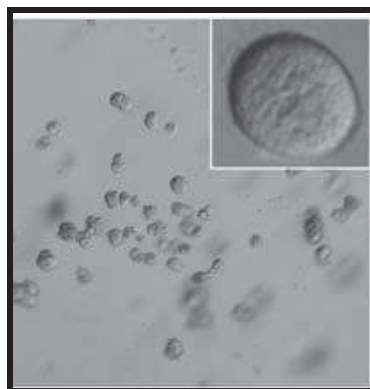


Figure 27. Follicules primordiaux de macaques après 3 jours de culture dans un gel d'alginate à 0,2 % ; un follicule primordial obtenu après dissociation enzymatique est encadré (Tiré de l'article de Hornick *et coll.* (140)).

La fibrine est également utilisée pour la culture des follicules isolés. Cette protéine biodégradable, constituée de fibrinogène et de thrombine, joue un rôle important dans la coagulation sanguine, et elle est souvent utilisée en tant qu'adhésif en chirurgie pour favoriser l'hémostase (Luyckx *et coll.*, 2013). Il a été démontré que la fibrine n'avait pas d'effet toxique sur les ovocytes et les embryons (Bar-Hava *et coll.*, 1999).

Une dégradation partielle et progressive des gels de fibrine a été observée, 24 heures après l'initiation d'une culture *in vitro* (Shikanov *et coll.*, 2009; Shikanov *et coll.*, 2011) (Figure 28). Cependant, cette dégradation est positive car elle permet de réduire la tension appliquée sur les follicules et donc de promouvoir l'augmentation du diamètre folliculaire. La dégradation du gel est corrélée à la survie et au développement folliculaire, ainsi l'absence de dégradation du gel autour des follicules serait caractéristique d'un follicule atrophique (Chiti *et coll.*, 2017a).

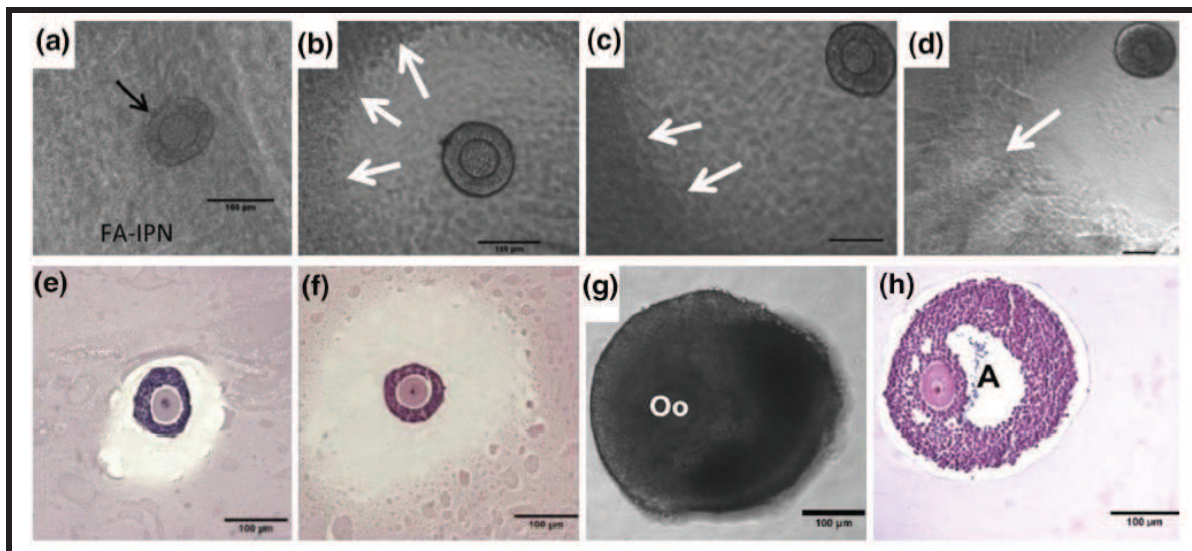


Figure 28. Photos représentant des follicules encapsulés dans une matrice mixte fibrine-alginate (FA), où l'on peut observer le processus de dégradation de la fibrine caractérisé par un anneau clair autour des follicules en développement. Observation de l'anneau de dégradation de la fibrine dans un champ lumineux à 0 (a), 2 (b), 4 (c) et 6 (d) jours de culture *in vitro*. Coupe cytologique de matrices FA montrant l'anneau de dégradation de la fibrine après 2 (e) et 3 (f) jours de culture, et un follicule en croissance (g,h). Barre d'échelle = 100 μ m; (Shikanov *et coll.*, 2011).

L'alginate peut être combiné à la fibrine pour l'obtention d'une matrice mixte, ce qui offre un environnement mécanique dynamique étant donné que les deux matériaux contribuent à la rigidité initiale de la matrice obtenue. La fibrine étant rapidement dégradée, la rigidité de la matrice n'est par la suite due qu'à la présence d'alginate (Vanacker and Amorim, 2017).

7.2.4. La culture multi-étapes

En 1999, Smitz et Cortvrindt avaient déjà suggéré que les follicules isolés d'une taille inférieure à 190 μm ne pouvaient pas survivre et croître *in vitro* jusqu'au stade antral en dehors du tissu et donc que la folliculogénèse devait se faire en plusieurs étapes en fonction du stade de développement folliculaire (Smitz and Cortvrindt, 1999).

La culture multi-étapes peut être divisée en 3 phases (Figure 29) :

- Premièrement, les fragments de cortex ovarien sont coupés, puis cultivés *in vitro* dans un milieu permettant l'activation des follicules primordiaux et primaires jusqu'au stade pré-antral.
- Deuxièmement, les follicules ayant atteint ce stade sont isolés mécaniquement et/ou enzymatiquement, puis cultivés *in vitro* dans un gel biodégradable, au sein d'un milieu riche en hormones afin de favoriser leur croissance.
- Troisièmement, une maturation folliculaire *in vitro* (MIV) est réalisée afin de finaliser la croissance des follicules antraux et récupérer les complexes cumulo-ovocytaires (CCO). Les CCO sont décoronés afin de récupérer les ovocytes bloqués en métaphase 2 et permettre leur développement jusqu'au stade embryonnaire (Telfer and McLaughlin, 2012).

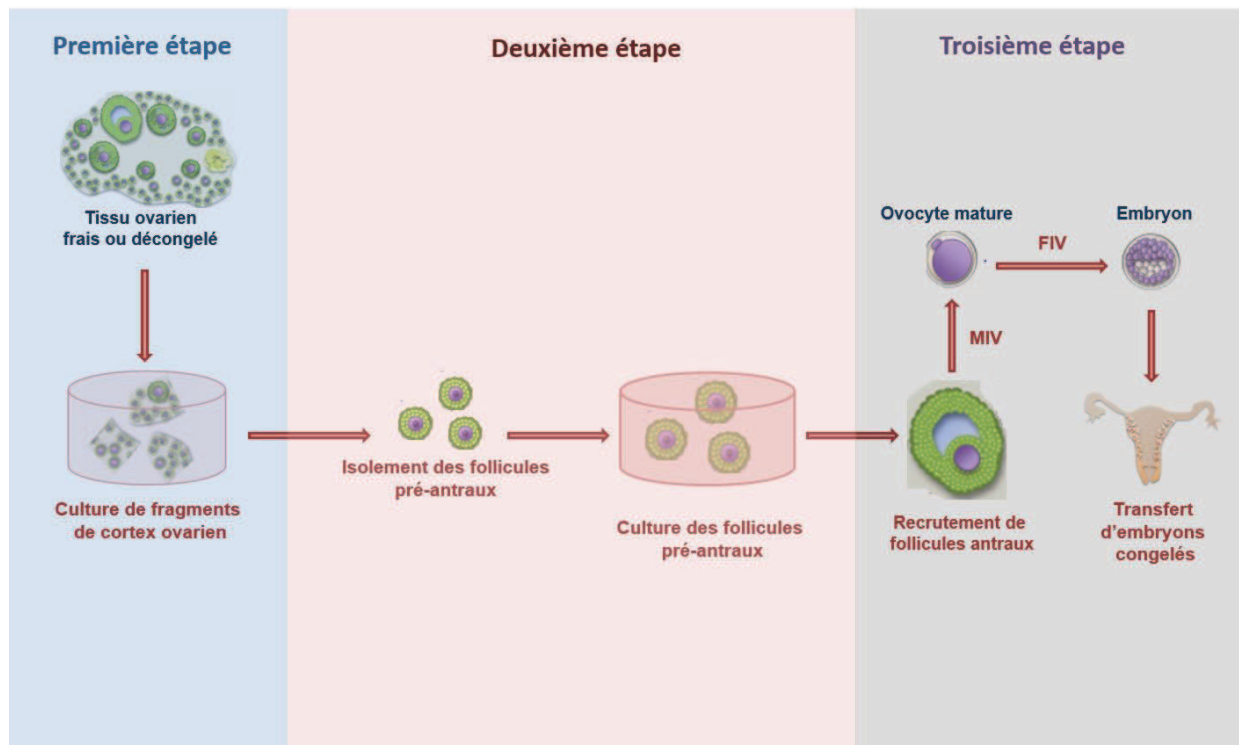


Figure 29. Schéma représentant la culture multi-étapes décrites par Telfer *et coll.*, 2008 (Telfer *et coll.*, 2008); Première étape : Culture *in vitro* de fragments de cortex ovarien préalablement découpés dans un milieu permettant l'activation folliculaire ; Deuxième étape : Isolement des follicules de grande taille et culture *in vitro* 3D jusqu'au stade antral ; Troisième étape : Maturation ovocytaire et transfert d'embryons congelés (Schéma modifié à partir de Kim *et coll.* (160)).

Une étude visant à cultiver des follicules primordiaux humains jusqu'au stade antral a été réalisée en utilisant la technique multi-étapes en 2008. Des fragments de cortex ovarien ont été cultivés durant 6 jours dans du milieu de culture dépourvu de sérum. Puis des follicules pré-antraux ont été isolés mécaniquement à partir de ces fragments et cultivés durant 4 jours en présence d'activine (Telfer *et coll.*, 2008).

L'activine, membre de la famille des TGF- β comme l'AMH et le GDF-9, est exprimée par les cellules de la granulosa et l'ovocyte des follicules pré-antraux. Il a été décrit que l'activine jouerait un rôle dans la croissance folliculaire et promouvoir la formation de l'antrum (Mizunuma *et coll.*, 1999; Zhao *et coll.*, 2001). L'ajout d'activine au milieu de culture utilisé a permis la croissance de 30 % des follicules jusqu'au stade antral.

Une récente étude, basée sur ce protocole de culture multi-étapes a permis l'obtention d'ovocytes humains au stade métaphase 2 (McLaughlin *et coll.*, 2018).

Malgré le faible nombre d'ovocytes matures obtenus après l'étape de maturation *in vitro*, cette étude a permis l'obtention d'une folliculogénèse *in vitro* complète chez l'Homme. Elle a prouvé la faisabilité et l'efficacité de la culture multi-étapes comme une potentielle alternative aux techniques actuelles de réutilisation de fragments de tissu ovarien cryopréservés.

7.2.5. Les risques de la culture de follicules ovariens isolés

Les gènes responsables de la quiescence des follicules primordiaux *in vitro* (PTEN, mTOR, FOXO3) peuvent également causer la formation de tumeurs des cellules de la granulosa lorsque ceux-ci sont mutés (Guzel and Oktem, 2017). Il reste important de voir l'effet de tels régulateurs à long terme sur la fonction des follicules ovariens dans des conditions *in vitro* avant d'envisager leur utilisation *in vivo* chez des patientes.

Dans des conditions *in vitro*, les follicules primordiaux présentent un schéma d'activation accéléré et tendent à se développer en follicules primaires plus rapidement qu'*in vivo* (Guzel and Oktem, 2017). En effet, *in vitro*, la balance entre activateurs et suppresseurs est perturbée du fait de l'inhibition de certains signaux endocriniens pouvant prévenir l'activation précoce des follicules primordiaux. De même, l'absence de facteurs ovariens locaux responsables de la coordination de la croissance des follicules durant leur culture après isolement (ajoutés au milieu de culture ou présents dans une matrice biodégradable) peut induire une perturbation de la communication entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui l'entourent. La croissance folliculaire observée n'est alors qu'une expansion rapide des cellules de la granulosa qui vont former une masse avec un ovocyte dont la maturation sera incomplète (Guzel and Oktem, 2017; Telfer and Zelinski, 2013).

7.3. L'activation folliculaire

Les mécanismes permettant la régulation de l'activation des follicules primordiaux ne sont pas encore très clairs. Cependant on sait aujourd'hui que ces mécanismes impliquent la mise en jeu d'une combinaison de facteurs inhibiteurs et stimulateurs de cette activation (Telfer and McLaughlin, 2012).

Il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques du PTEN *in vitro* induit une augmentation de l'activation des follicules primordiaux humains isolés après 6 jours de culture (McLaughlin *et coll.*, 2014). A l'opposé, une étude sur des cultures de fragments de cortex ovarien humain a montré que l'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur des mTOR, induit une diminution de l'activation des follicules primordiaux, mais également une mort des ovocytes au sein des follicules (McLaughlin *et coll.*, 2011).

Des stimulateurs de la voie Akt peuvent également être utilisés afin de promouvoir l'activation des follicules dormants. Des expériences chez la souris ont montré que 740Y-P, un phospho-peptide, permettrait sa stimulation par sa capacité à se lier au domaine SH2 de la sous-unité p85 des PI3K. Une fois activée, PI3K va convertir PIP2 en PIP3, et l'accumulation de PIP3 va par la suite stimuler la phosphorylation d'Akt (Li *et coll.*, 2010).

L'équipe de Kawamura *et coll.*, 2013 a démontré que la fragmentation des tissus ovariens jouerait également un rôle dans l'activation folliculaire. En effet, la fragmentation en petits morceaux de 1-2 mm² induirait une perturbation de la voie de signalisation Hippo qui permet de réguler la polymérisation des filaments d'actine, ce qui mènerait à une augmentation de l'expression de facteurs de croissance responsables de la croissance folliculaire et la génération d'ovocytes matures (Kawamura *et coll.*, 2013) (Figure 30).

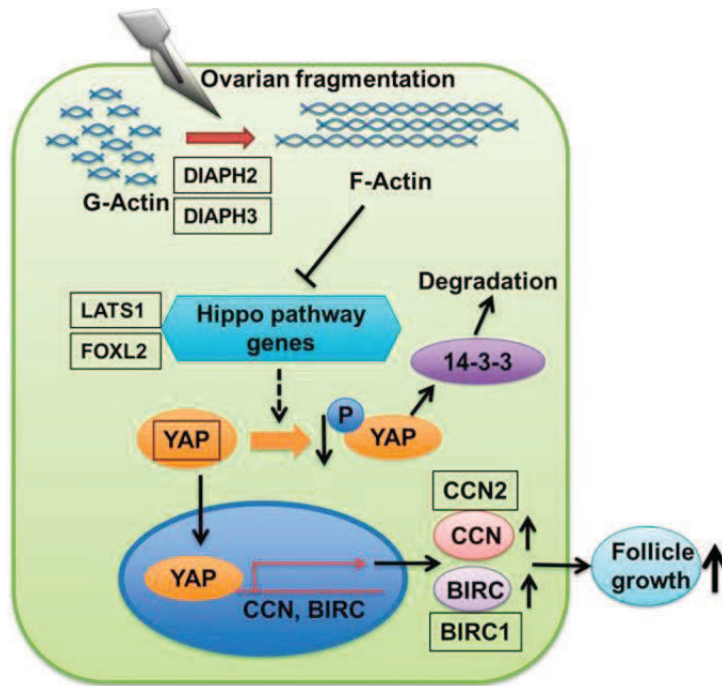


Figure 30. Schéma représentant les gènes impliqués dans la fragmentation de tissus ovariens, la voie de signalisation Hippo et la croissance folliculaire : la polymérisation d'actine-F induit une augmentation du gène YAP au niveau du noyau de l'ovocyte, ce qui induit une augmentation de l'expression du facteur de croissance CCN et de BIRC, un inhibiteur de l'apoptose (Kawamura *et coll.*, 2013).

A partir de ces différents résultats chez la souris, des études cliniques ont été effectuées chez des patientes souffrant d'insuffisance ovarienne précoce (IOP) à la suite d'une pathologie nécessitant l'administration de traitements gonadotoxiques. En effet, les patientes présentant une IOP peuvent encore posséder un nombre limité de follicules primordiaux, malgré l'absence de follicules antraux sélectionnables. Pour les patientes ne possédant aucun follicule primordial résiduel, l'activation folliculaire n'est pas envisageable.

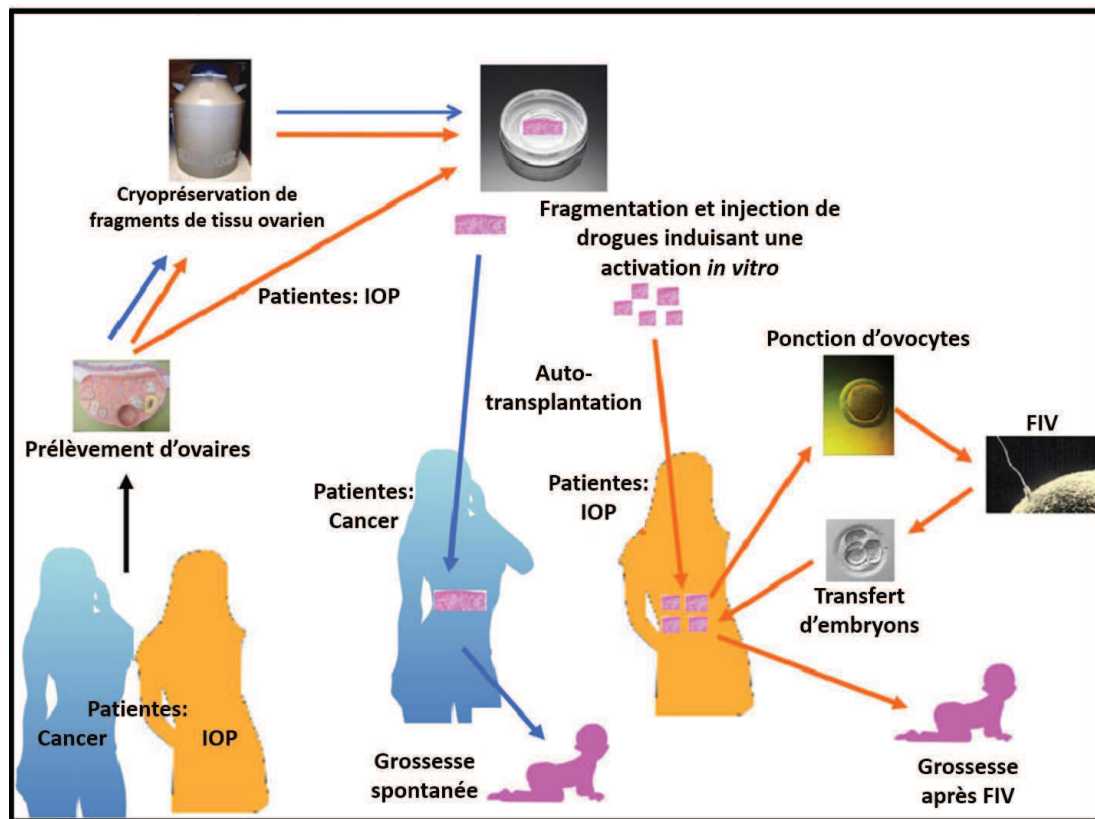


Figure 31. Schéma comparatif entre la transplantation de tissu ovarien cryoconservé et la greffe de fragments de tissu ovarien après traitement consistant en l'activation folliculaire *in vitro* (Schéma modifié à partir de Kawamura *et coll.* (153)).

Les tissus ovariens sont fragmentés en une centaine de petits « bouts de gomme » de 1 à 2 mm² afin d'induire la perturbation de la voie de signalisation Hippo, puis des drogues testées pour leur rôle dans la stimulation d'Akt (tels que les inhibiteurs de PTEN et les activateurs des PI3Ks) sont injectés *in vitro* dans les fragments obtenus. Ces fragments sont ensuite laissés 48 heures dans un milieu de culture adapté avant d'être auto-transplantés chez la patiente au niveau d'une poche créée près de la trompe de Fallope (Figure 31). Environ un tiers de l'ovaire prélevé est utilisé pour effectuer les techniques d'activation *in vitro*.

A l'aide de ces nouveaux traitements, deux naissances ont pu être rapportées jusqu'à aujourd'hui après autogreffe de tissu ovarien cryoconservé (Kawamura *et coll.*, 2015; Kawamura *et coll.*, 2013; Suzuki *et coll.*, 2015).

L'activation *in vitro* suivie d'une greffe de tissu ovarien frais a également été réalisée, à l'aide du même protocole, chez des femmes souffrant d'insuffisance ovarienne précoce.

Pour l'instant, seule une naissance a pu avoir lieu en utilisant du tissu frais. Cette technique a pour avantage de pouvoir être effectuée dans un délai très court, de minimiser le risque d'altération des tissus pouvant potentiellement avoir lieu par cryopréservation et de pouvoir être effectué en parallèle d'une congélation de fragments d'ovaire pour une réutilisation ultérieure (Zhai *et coll.*, 2016).

L'activation *in vitro* est une technique prometteuse, cependant afin de devenir une nouvelle thérapie applicable à toutes les patientes éligibles, des améliorations restent à effectuer.

7.4. La construction et l'implantation d'un ovaire artificiel

L'ovaire artificiel correspond à un biomatériau biocompatible et biodégradable dans lequel sontensemencés les follicules ovariens, ainsi que des cellules stromales ou des cellules endothéliales dans certains cas. Le but est de mimer l'environnement auquel les follicules ovariens sont confrontés *in vivo*, afin de favoriser leur développement et maintenir leur survie avant que ceux-ci ne soient transplantés chez la patiente et ne se réorganisent *in vivo*. La composition du biomatériau utilisé, notamment la porosité et la rigidité, permet aux cellules adjacentes d'infiltrer l'ovaire artificiel une fois la greffe effectuée, et donc de favoriser des interactions avec les follicules ovariens contenus à l'intérieur (Chiti *et coll.*, 2016). La greffe d'un ovaire artificiel pourrait donner la possibilité à des patientes, dont le risque de maladie résiduelle ne permet pas d'effectuer de greffe de tissu ovarien cryoconservé, de restaurer leur fertilité à l'aide de leurs propres follicules isolés. Tout comme pour la culture 3D, la fibrine (Chiti *et coll.*, 2018; Chiti *et coll.*, 2016; Kniazeva *et coll.*, 2015; Luyckx *et coll.*, 2014; Luyckx *et coll.*, 2013; Soares *et coll.*, 2015b) et l'alginate (Camboni *et coll.*, 2013; Laronda *et coll.*, 2014; Vanacker *et coll.*, 2012) sont les principaux candidats pour la production d'un ovaire artificiel.

7.4.1. L'alginate

Des expériences consistant en la greffe d'un ovaire artificiel à base d'alginate ont été menées sur des souris ayant précédemment subi une ovariectomie.

Des follicules primordiaux, primaires et secondaires isolés ainsi que des cellules ovariennes (cellules stromales et cellules endothéliales) ont été implantés dans des billes composées d'alginate de grade GMP appelées NovaMatrix alginate SLM, puis greffées dans une poche créée au niveau de la cavité péritonéale durant une semaine. Le NovaMatrix alginate SLM, de par sa composition, possède des propriétés de dégradation et de flexibilité supérieure à l'alginate seul (Vanacker *et coll.*, 2014). Après une semaine, la survie des follicules était importante ainsi que leur prolifération; de plus, des signes de vascularisation ont pu être observés (Figure 32).

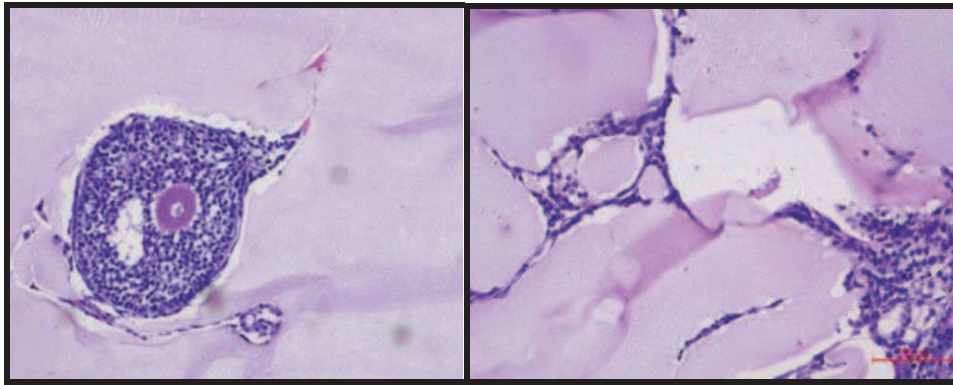


Figure 32. Coupe histologique d'un ovaire artificiel à base d'alginate après une semaine de greffe, par coloration à l'hématoxyline-éosine. A gauche un follicule antral de souris au sein d'une bille d'alginate, à droite des cellules ovariennes de souris au sein d'une bille d'alginate. Barre d'échelle = 100 μ m (Tirée de Vanacker *et coll.* (296)).

Cependant de nombreuses billes se sont cassées durant la greffe et le niveau de dégradation de l'alginate post-greffe n'a pu être précisément évalué. L'alginate de grade GMP comporterait donc certaines limites en termes de biodégradation et bioadhésion.

7.4.2. La fibrine

La fibrine semble être plus adaptée pour la création d'un ovaire artificiel. En effet, de par sa composition et notamment la présence de séquences d'acides aminés impliquées dans l'interaction cellule-matrice extracellulaire, la fibrine offre le support optimal à la prolifération, la différenciation, les échanges et l'attachement cellulaire (Paulini *et coll.*, 2016). Une étude récente de Chiti *et coll.* a permis de montrer que l'épaisseur des fibres et la rigidité de matrices à base de fibrine, à de fortes concentrations (50 mg/ml de fibrinogène et 50 UI/ml de thrombine), étaient comparables à celles du tissu ovarien humain (Chiti *et coll.*, 2018). Des expériences d'autogreffe ont été effectuées chez la souris, mais cette fois en utilisant différentes combinaisons de biomatériaux tels qu'un mélange de fibrine/alginate (FA), fibrine/collagène (FC) ou fibrine seule. Une étude a permis de montrer que, ni le taux de dégradation, ni la survie des follicules après greffe de FA ou FC, n'étaient comparables aux résultats obtenus avec la fibrine seule. L'autogreffe de billes de fibrine contenant des follicules primordiaux, primaires et secondaires a pu aboutir à la naissance de souriceaux en bonne santé pour 2 des 6 souris greffées. De plus, une des souris ovariectomisées a pu avoir deux portées différentes, ce qui montrent que les follicules implantés ne se seraient pas tous activés en une seule vague, contrairement à ce qui pourrait être constaté avec l'autotransplantation ou l'activation *in vitro* de tissu ovarien cryoconservé (Kniazeva *et coll.*, 2015).

Plusieurs études prometteuses de greffes de gel de fibrine contenant des follicules isolés murins, prémices d'un ovaire artificiel, ont permis de montrer qu'il n'y avait aucun impact négatif de la fibrine sur la croissance, le taux de recouvrement et la survie des follicules à 7 jours post-greffe. Cependant il a pu être observé que la survie des follicules secondaires était supérieure à celle des follicules primordiaux et primaires (Chiti *et coll.*, 2016; Luyckx *et coll.*, 2014; Luyckx *et coll.*, 2013). Une étude a été réalisée avec des follicules isolés humains ensemencés dans un gel de fibrine. Au cours de cette étude de Paulini *et coll.*, les gels de fibrine contenant des follicules isolés humains ont été xéno greffés chez des souris durant 7 jours. Des concentrations croissantes en gel ont été testées, et les concentrations de 50 mg/ml de fibrinogène et 10 UI/ml de thrombine ont semblé être optimales pour la croissance et la survie d'un grand nombre de follicules fonctionnels (Paulini *et coll.*, 2016). L'ajout de facteurs de croissance (tels que le VEGF) peut également être effectué afin d'optimiser l'efficacité de la fibrine.

7.4.3. La décellularisation ovarienne

Une alternative à l'utilisation de biomatériaux serait l'utilisation d'un ovaire décellularisé. En effet, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, les organes décellularisés ont déjà prouvé leur efficacité en termes de structure et de fonction après réimplantation (Scarritt *et coll.*, 2015). La décellularisation consiste en l'utilisation de détergents, de sels, d'enzymes ou de moyens physiques afin d'enlever les cellules présentes au sein d'un tissu ou d'un organe tout en respectant au mieux l'architecture, la composition et les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire (MEC) (Badylak *et coll.*, 2011). Cette méthode permet de garder la forme et la structure de l'organe dans son intégrité, tout en éliminant les cellules malignes potentiellement présentes. Les matrices issues de tissus décellularisés ont pour avantage d'être moins coûteuses et non limitées par leurs propriétés mécaniques contrairement aux matrices synthétiques et biodégradables (Motamed *et coll.*, 2017). La décellularisation d'ovaire a été effectuée sur des fragments humains et bovins par Laronda *et coll.* (172) (Figure 33).

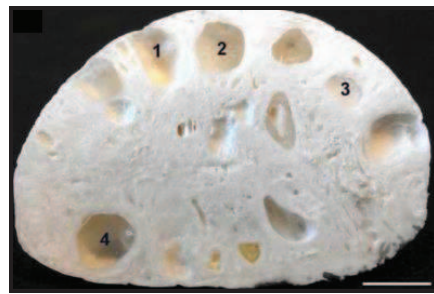


Figure 33. Photo d'un ovaire bovin entier décellularisé au 0,1 % SDS durant 28 jours (Laronda *et coll.*, 2015).

Dans cette étude, des fragments ovariens cryopréservés de vache ont été décongelés puis décellularisés avec du SDS (Sodium Dodécane Sulfate) 0,1 % en excès durant 24 heures. Des cellules ovariennes de souris préalablement isolées puis cultivées ont ensuite été implantées au sein des fragments de tissu ovarien bovin décellularisés. L'ensemble a finalement été laissé en culture durant 2 jours avant d'être greffé au niveau de la capsule rénale de souris ovariectomisées, puis analysé au bout de deux à quatre semaines post-greffe.

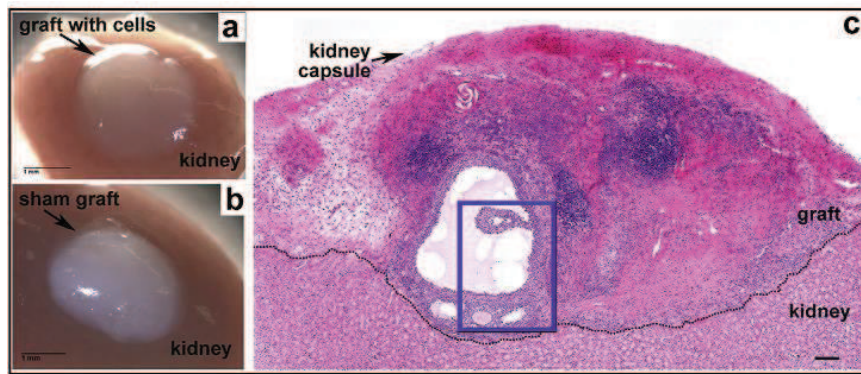


Figure 34. Photos d'un fragment de tissu ovarien bovin décellularisé greffé sous la capsule rénale d'une souris ovariectomisée, avec (a) ou sans (b) cellules ovariennes de souris ; Barre d'échelle = 1mm ; (c). Coupe histologique sagittale du greffon avec deux follicules visibles (encadré bleu) après coloration à l'hématoxyline-éosine; Barre d'échelle = 100 μ m (Laronda *et coll.*, 2015).

La greffe de fragments d'ovaires bovins recellularisés a permis de restaurer un niveau d'œstradiol et d'inhibine A similaires aux groupes contrôles (souris saines non greffées). De plus, des signes de développement sexuels caractéristiques de l'initiation de la puberté (ouverture de l'orifice vaginal, première manifestation de la maturité sexuelle chez la femelle) ont pu être observés chez les souris greffées (Laronda *et coll.*, 2015) (Figure 34).

Le SDS utilisé dans cette étude est un détergent fréquemment utilisé en tant qu'agent chimique pour la décellularisation de tissus ou d'organes. Le SDS est un détergent anionique qui possède sur sa tête hydrophile des charges négatives qui vont permettre la solubilisation des membranes cytoplasmique et nucléaire. Cependant, il peut également dénaturer les protéines de la MEC, ce qui peut avoir un impact négatif sur la capacité de recellularisation du greffon (Faulk *et coll.*, 2014). L'utilisation de SDS n'est pas autorisée pour des études cliniques, la décellularisation du tissu ovarien humain nécessiterait donc d'effectuer des tests préalables avec un agent moins nocif.

7.5. L'utilisation de cellules souches

7.5.1. Les cellules souches ovariennes

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence la présence de cellules souches ovariennes (OSCs ou « ovarian stem cells ») ou ovogonies dans le tissu ovarien de femmes adultes. Cette population de cellules a pu être isolée à l'aide d'une technique de tri cellulaire (FACS : « Fluorescence Activated Cell Sorting ») (Grieve *et coll.*, 2015; White *et coll.*, 2012). Lorsque ces cellules sont mises en culture *in vitro* en présence de cellules stromales, elles aboutissent à la formation de structures similaires aux follicules ovariens (White *et coll.*, 2012) (Figure 35). Ces structures de type folliculaire, une fois maturées *in vitro* puis injectées chez la souris, ont pu donner des souriceaux viables (Gheorghisan-Galateanu *et coll.*, 2014).

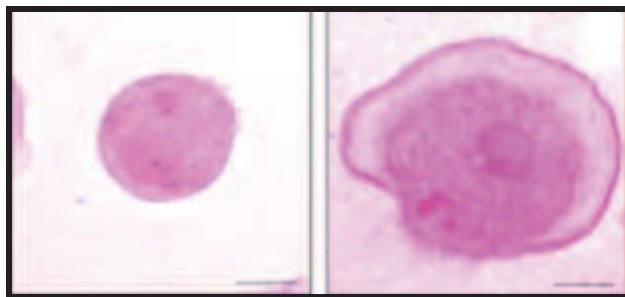


Figure 35. Photos de larges structures de type folliculaire obtenues à partir de la culture de cellules souches ovariennes humaines après 21 jours de culture *in vitro*, par coloration à l'hématoxyline-éosine. Barre d'échelle = 20 μm (Parte *et coll.*, 2014).

Cependant, cette population de cellules souches ovariennes ne représente que 1,7 % de la population ovarienne totale (5-8 μm de diamètre), et chez les femmes présentant une insuffisance ovarienne cette population peut être totalement absente (Moreno *et coll.*, 2015).

Les cellules souches embryonnaires (ESs = « embryonic stem cells ») et les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs = « induced pluripotent stem cells ») pourraient apporter de nouvelles solutions (Figure 36).

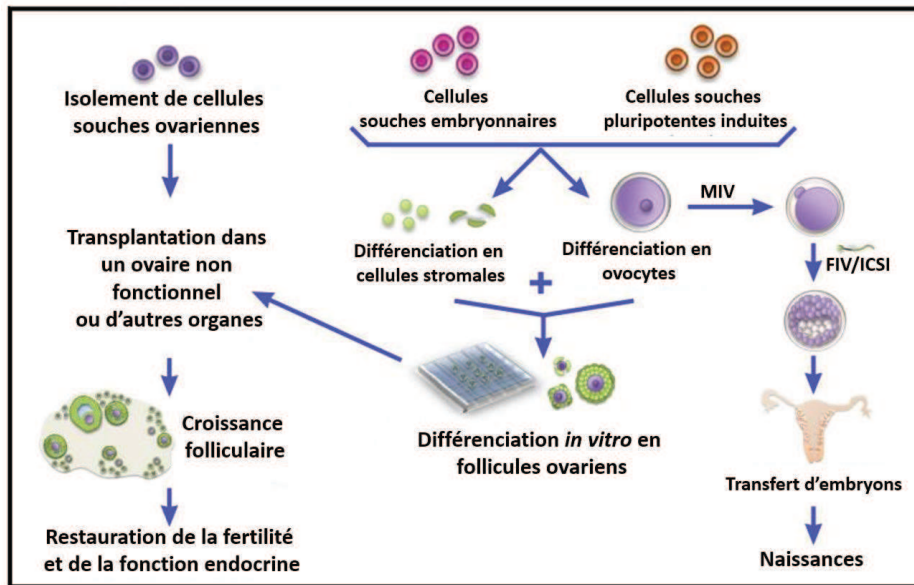


Figure 36. Schéma représentant les différentes alternatives de préservation de la fertilité féminine basées sur l'utilisation de cellules souches (Schéma modifié à partir de Kim *et coll.* (160)).

7.5.2. Les cellules souches embryonnaires

A partir de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (hESCs), une équipe a réussi à obtenir des cellules de structures comparables aux follicules dites « *follicle-like cells* ». Ces hESCs ont été transduites à l'aide d'un lentivirus exprimant DAZL et BOULE, des protéines de liaisons de l'ARN exprimées par les cellules germinales et impliquées dans l'entrée en méiose. Elles ont ensuite été exposées à des milieux de différenciation contenant notamment BMP15 et GDF9 qui sont exprimés par les follicules pré-antraux (Cf. paragraphe 3.2.1.). Les « *follicle-like cells* » obtenues contiennent en périphérie des cellules en multicouches qui expriment de l'AMH et ressemblent aux cellules de la granulosa, et au centre une cellule de type ovocytaire dite « *oocyte-like cell* ». Une fois xénotransplantées chez la souris, ces « *follicle-like cells* » prennent une apparence similaire aux follicules primaires, avec des cellules en périphérie de formes cubiques (Jung *et coll.*, 2017) (Figure 37).

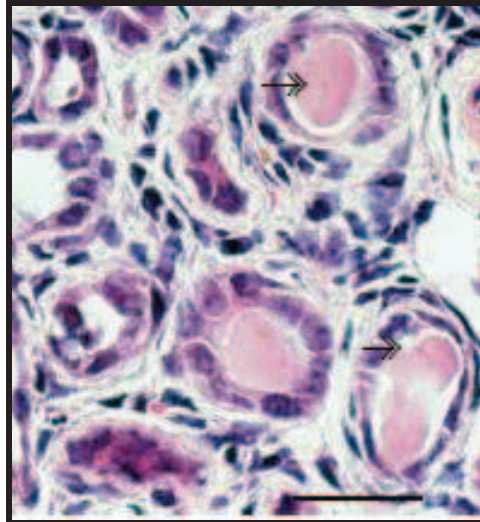


Figure 37. Coupe histologique de « follicle-like cells » obtenues à partir d'hESCs xéno greffées dans un rein de souris. La double flèche montre la vésicule germinale observée au centre de la structure (D'après Jung *et coll.* (151)).

7.5.3. Les cellules souches pluripotentes induites

Takahashi et Yamanaka ont prouvé l'existence des iPSCs en 2006 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules souches sont obtenues à partir de la reprogrammation de cellules somatiques, grâce à l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques. Les iPSCs ont la capacité de s'autorenouveler et sont pluripotentes. Ces cellules souches ont pu être différenciées en cellules similaires aux cellules ovariennes après culture dans un milieu contenant notamment des hormones gonadotropiques (AMH, FSH, œstradiol) (Liu *et coll.*, 2016) (Figure 38).

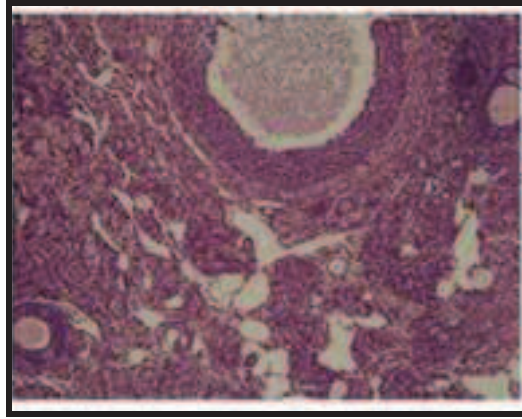


Figure 38. Coupe histologique d'un fragment d'ovaire issu de souris en insuffisance ovarienne précoce après xéno greffe de cellules de structure similaires aux cellules ovariennes issues d'iPSCs, après coloration à l'hématoxyline et éosine (Tiré de Liu *et coll.* (182)).

Des expériences de xéno greffes consistant à transplanter des cellules de structures similaires aux cellules ovariennes, issues de la différenciation d'iPSCs chez des souris en insuffisance ovarienne précoce induite, aurait permis de restaurer une fonction ovarienne et de promouvoir une maturation folliculaire chez ces souris.

Contrairement aux cellules souches embryonnaires, qui peuvent se différencier en cellules de la lignée germinale après injection dans des blastocystes, les iPSCs peuvent être générées à partir d'un nombre important de types cellulaires. De plus, les iPSCs ne nécessitent pas la formation de stades embryonnaires intermédiaires, et poserait donc moins de problèmes éthiques que l'utilisation d'ESs (Gosden, 2013).

Le risque d'induire des aberrations chromosomiques et donc des mutations génomiques au sein des cellules obtenues ne peut pour l'instant être exclu (Prigione *et coll.*, 2011).

OBJECTIFS

L'amélioration de la prise en charge et des traitements proposés aux patientes atteintes de cancer a permis une augmentation considérable de leur espérance de vie. Néanmoins, la toxicité des traitements nécessaires à leur rémission peut être à l'origine d'un risque d'infertilité dont la gravité dépend de différents facteurs tels que l'âge de la patiente, le type de traitement envisagé, la dose et la durée de celui-ci. Pour les petites filles pré-pubères, les femmes pour lesquelles une stimulation ovarienne est contre-indiquée et les femmes dont l'administration d'un traitement hautement gonadotoxique ne peut être repoussée dans le temps, la cryoconservation de fragments de tissu ovarien est la seule technique actuellement disponible. Afin de restaurer la fertilité de ces patientes, les fragments de tissu ovarien cryopréservés ne peuvent être réutilisés que par autogreffe. Toutefois, pour les pathologies néoplasiques à risque de localisation métastatique ovarienne, tel que les leucémies aiguës, l'autogreffe de fragments de tissu ovarien cryopréservés n'est pas recommandée, le risque que des cellules malignes soient réintroduites chez la patiente lors de la greffe étant trop important. Pour ces patientes, le développement de techniques alternatives à l'autogreffe, basé sur l'utilisation de follicules ovariens isolés, est nécessaire.

L'objectif de cette thèse a été de qualifier des follicules ovariens obtenus à partir de la dissociation de fragments de tissu ovarien cryopréservés pouvant être utilisés en thérapie humaine et de développer des techniques permettant la réutilisation de ces follicules tout en assurant la sécurité carcinologique des préparations de follicules ovariens ainsi obtenues.

Afin de dissocier les fragments de tissu ovarien cryopréservés, l'utilisation d'une enzyme de grade clinique autorisée en France est primordiale. L'objectif a donc été dans un premier temps d'évaluer l'efficacité d'une collagénase NB6 possédant un grade GMP en comparaison à une collagénase IA utilisée en routine au sein du laboratoire et une libérase DH considérée comme l'enzyme de référence afin d'obtenir des follicules ovariens isolés. Les follicules ovariens obtenus ont par la suite été qualifiés en termes de rendement, de viabilité, de morphologie et d'aptitude à la croissance folliculaire.

Une fois la technique d'isolement des follicules ovariens validée, le second objectif a été d'étudier les follicules ovariens obtenus après plusieurs jours de culture *in vitro*. Cette étape devant permettre de confirmer les résultats précédemment obtenus avec la collagénase NB6. Cette étape devait également permettre de tester différents moyens de conditionnement des follicules ovariens isolés, la présence d'un support matriciel afin de favoriser la survie et le développement des follicules étant généralement préconisé et étant importante pour aborder une stratégie de reconstruction ovarienne.

Enfin, l'objectif final a été de valider un modèle expérimental d'ajout de cellules leucémiques à différentes concentrations au sein de suspensions ovariennes issues de tissus sains de référence. Cette dernière étape a eu pour but de montrer la fiabilité de notre technique afin d'éliminer les cellules leucémiques potentiellement présentes au sein des fragments.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Traitement du tissu ovarien

1.1. Collecte du tissu ovarien

Les fragments de tissu ovarien ont été obtenus au cours de résections percœlioscopiques effectuées chez des patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques. Les fragments ont été prélevés à l'aide de forceps, au niveau de sites avasculaires, avant électrocoagulation. Les fragments ont été immédiatement transportés au laboratoire dans un pot ECBU contenant du Leibovitz L-15® (Eurobio, France), maintenu à +4° C. L'âge moyen des patientes dont les fragments ont été utilisés a été de 29 ans (minimum = 25 ans; maximum = 37 ans, n = 16). Toutes les patientes ont donné leur consentement libre et éclairé. L'utilisation de tissu ovarien humain a été approuvée par le comité d'éthique clinique du CHRU de Besançon en 2013.

Le tissu ovarien prélevé comme précédemment décrit a été considéré comme tissu sain de référence, étant dépourvu de cellules néoplasiques. Ce tissu a été utilisé pour toutes nos expériences de codification et de qualification du tissu ovarien cryoconservé.

1.2. Congélation/décongélation des fragments de cortex ovarien

Le protocole de congélation/décongélation du tissu ovarien a précédemment été décrit et établi au sein du laboratoire (Fauque *et coll.*, 2007). Les fragments de cortex ovarien ont été transférés dans des cryotubes (VWR, France) contenant 1,8 ml de solution de congélation composée de 1,5 mol/l de diméthyl sulfoxide (DMSO ; Sigma, France) et de 0,1 mol/l de sucrose (Pharmacie de Besançon, France), dans du Leibovitz L-15 contenant 10 % de sérum humain AB décomplémenté (EFS Bourgogne Franche Comté). Le sérum AB a été obtenu à partir de donneurs masculins ayant donné leur consentement libre et éclairé. La décomplémentation du sérum a été effectuée par une incubation de 30 minutes à +56° C, puis le sérum obtenu a été conservé à +4° C. Les fragments ont ensuite été incubés à +4° C durant 30 minutes sous agitation. Puis, ils ont été congelés suivant le protocole de congélation lente avec « seeding » manuel dans un congélateur programmable (Planer® 360 ou 560; Cryobiosystem, France) ou par « seeding » automatique (Nano-Digitcool; Cryobiosystem, France).

La congélation lente s'est déroulée en trois étapes; la première étape a consisté en une descente en température à la vitesse de -2°C par minute, de $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à -9°C . Lorsque le « seeding » manuel a été effectué, les tubes ont été extraits du congélateur puis mis en contact rapide avec de l'azote liquide avant d'être réintroduit dans le congélateur. Pour le « seeding » automatique, une brumisation d'azote liquide sur les cryotubes a été programmée provoquant une descente en température rapide de la cuve (de -9°C à -30°C). La deuxième étape a ensuite consisté en un abaissement lent de la température jusqu'à -40°C à la vitesse de $-0,3^{\circ}\text{C}$ par minute. Enfin, la troisième et dernière étape a consisté en une descente en température rapide jusqu'à -140°C à la vitesse de -10°C par minute. Lorsque la congélation a été complète, les fragments ont été stockés dans de l'azote liquide à -196°C jusqu'à décongélation.

Les fragments ont été décongelés par incubation des cryotubes à $+37^{\circ}\text{C}$ durant 5 minutes. Ils ont ensuite été lavés dans des solutions de concentrations décroissantes en DMSO 1,5 mol/l (5 minutes), 1 mol/l (5 minutes), 0,5 mol/l (10 minutes) contenant 0,05 mol/l de sucrose dans du Leibovitz L-15 additionné de 20 % de sérum humain AB décomplémenté.

1.3. Dissociation des fragments de cortex ovarien

Le protocole de dissociation enzymatique et mécanique du cortex ovarien, précédemment codifié au sein du laboratoire (Fauque *et coll.*, 2007), a été modifié comme suit. Les fragments ont d'abord été coupés en petits morceaux d'environ 1 mm^3 à l'aide de ciseaux stériles. Les fragments ont ensuite été placés dans des cryotubes contenant 1,8 ml de collagénase de concentration égale à 200 UI/ml. Deux collagénases ont été utilisées lors de nos expériences : une collagénase de type Ia (Sigma, France) utilisée en routine au sein du laboratoire et une collagénase NB6 de norme GMP (« Good Manufacturing Practices » ; Serva Electrophoresis GmbH ; Coger, France) hautement purifiée.

Les fragments ont été incubés 3 heures à $+37^{\circ}\text{C}$ et vortexés toutes les 30 minutes pendant cette incubation. L'activité enzymatique a été inhibée par l'ajout de 30 % de sérum humain AB décomplémenté (1 volume/3 volumes). La suspension obtenue a ensuite été filtrée à travers un filtre en nylon de $60\ \mu\text{m}$ (Fisher Scientific, France).

Pour comparatif, des fragments ont également été dissociés avec la libérase DH (Roche, France). En effet, des fragments ont été placés dans des cryotubes contenant 0,28 Wunsch Units/ml de libérase DH.

Puis les fragments ont été incubés 75 à 90 minutes à +37° C et vortexés toutes les 30 minutes pendant cette incubation. L'activité enzymatique a également été inhibée par l'ajout de 30 % de sérum humain AB décomplémenté (1 volume/3 volumes). La suspension obtenue n'a pas été filtrée afin de conserver les conditions de dissociation actuellement décrites dans la littérature.

1.4. Décellularisation

Une solution de Sodium Dodécane Sulfate 0,1 % (SDS, Euromedex, France) a été reconstituée par dilution dans du PBS 1X à partir d'une solution initiale de SDS 20 %. Cette solution a ensuite été mise sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté. Puis, les fragments de cortex ovarien décongelés ont été placés dans ce bain durant 24 heures sous agitation de vitesse moyenne. Au bout des 24 heures, les fragments ont été lavés plusieurs fois dans des bains successifs de 5 minutes de PBS 1X. Enfin, les échantillons ont été fixés dans du formol 4 % afin d'être analysés.

2. Modèle expérimental d'ajout de cellules leucémiques dans une suspension folliculaire

2.1. Congélation/décongélation des cellules leucémiques

Au cours de nos expériences, des cellules leucémiques provenant de la moelle osseuse ou du sang de patients (n = 8) atteints de leucémies aigües myéloïdes et lymphoïdes dont l'immunophénotype associé était connu, ont été utilisées. Les cellules leucémiques ont été collectées lors du diagnostic puis congelées et stockées à -196° C (autorisation de collection des produits biologiques n° DC-2008-713, Département de recherche et d'innovation ; CRB F. Cabanne, Dijon-Besançon, France). Les cryotubes contenant les cellules leucémiques ont été laissés à décongeler 5 minutes à +37° C, puis la solution contenant les cellules leucémiques a été mise en suspension goutte par goutte dans 10 ml de RPMI 1640 Glutamax (« Roswell Park Memorial Institute medium »; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) contenant 20 % de SVF (sérum de veau fœtal ; PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Allemagne).

Les cellules ont été laissées à +37° C durant 15 minutes. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 300 g durant 7 minutes. Le surnageant a été enlevé et le culot obtenu a été mis en suspension dans 1 ml de RPMI contenant 20 % de SVF. Les cellules ont ensuite été comptées à l'aide d'une cellule de Thoma. Pour les besoins de l'expérience, environ 2 à 1,5 millions de cellules leucémiques ont été nécessaires. Les cellules ont été laissées dans de la glace pilée (de 0 à +4° C) ou au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

2.2. Marquages des cellules leucémiques

Les cellules leucémiques décongelées ont été centrifugées à 300 g durant 7 minutes puis elles ont été resuspendues dans 5 µM de CFDA SE « Cell tracer » (Vybrant® CFDA SE Cell tracer kit, Life Technologies SAS, France) d'après le protocole du fournisseur Soares *et coll.* (268). L'utilisation du CFDA SE « Cell tracer » a permis de marquer les cellules leucémiques avant que celles-ci ne soient ajoutées à la suspension ovarienne. Ce marquage a été caractérisé par une fluorescence verte intense (excitation/émission : ~492/~517 nm) observable au microscope inversé à fluorescence (CKX41, Olympus, France). Le marquage des cellules leucémiques à l'aide du CFDA SE « Cell tracer » a été utilisé ponctuellement comme contrôle lors des techniques d'addition de cellules leucémiques suivi de lavages afin de s'assurer que la technique avait bien fonctionné.

2.3. Addition des cellules leucémiques dans la suspension folliculaire

La suspension folliculaire obtenue après filtration a été répartie à volume égal (400 µl minimum par tube), dans 4 tubes différents, puis les cellules leucémiques ont été ajoutées dans les suspensions folliculaires en fonction du nombre total de cellules disponibles.

Dans le tube numéro 1, 1.10^6 cellules leucémiques ont été ajoutés à la suspension folliculaire.

Dans le tube numéro 2, 1.10^5 cellules leucémiques ont été ajoutés à la suspension folliculaire.

Dans le tube numéro 3, 1.10^4 cellules leucémiques ont été ajoutés à la suspension folliculaire.

Dans le tube numéro 4, aucune cellule leucémique n'a été ajoutée à la suspension folliculaire (tube témoin) (Figure 39).

La suspension de cellules leucémiques restante a été utilisée comme contrôle positif pour la détection des cellules leucémiques.

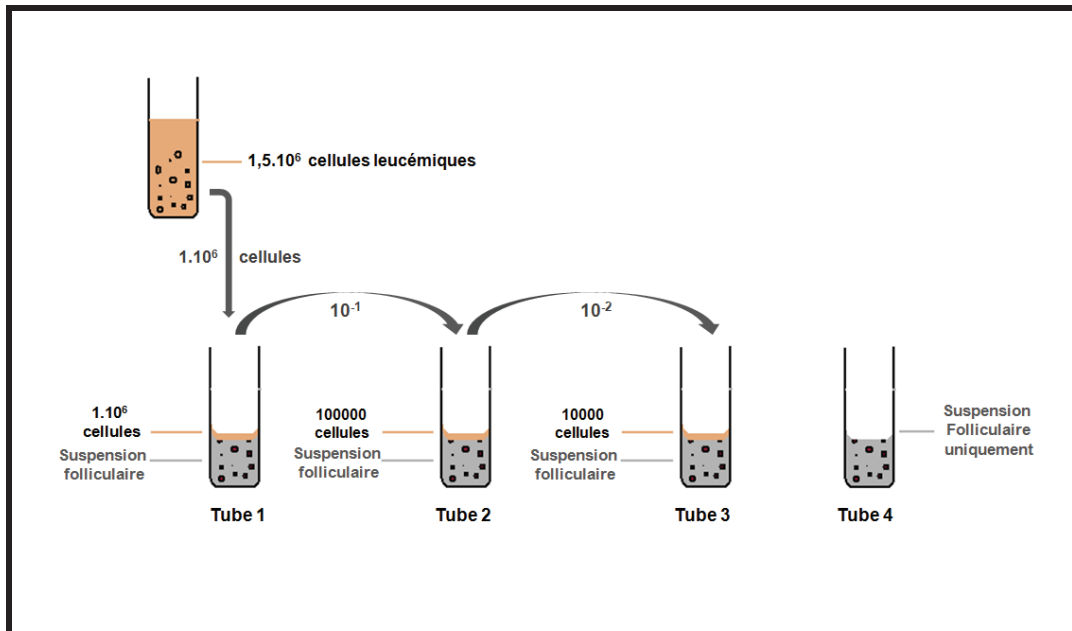


Figure 39. Addition de cellules leucémiques, par dilutions successives, au sein de suspensions folliculaires.

Dans un cas, le nombre de cellules leucémiques ayant été insuffisant, 10^5 , 10^4 et 10^3 cellules ont respectivement été ajoutées dans les suspensions folliculaires.

2.4. Isolement des follicules primordiaux

Pour chaque tube, 200 μ l de la suspension obtenue, contenant des cellules leucémiques, des cellules ovariennes et des follicules ovariens (tube témoin), ont été transférés dans une goutte de 100 μ l de milieu de fécondation *in vitro* (IVF™; Vitrolife, France), sous huile Ovoil™ (Vitrolife), déposée dans une boîte de pétri (boîte de pétri pour IVF ICSI Nunc™, 35 x 10 mm, ThermoFisher Scientific, France). A l'aide d'une loupe binoculaire, les follicules ont été isolés avec une pipette de dénudation de 130 -133 μ m de diamètre interne (Vitrolife). Les follicules obtenus ont été transférés dans une goutte de 30 μ l de milieu IVF, sous huile Ovoil, déposée dans une boîte 4 puits (Nunc™, ThermoFisher Scientific, France). Puis ils ont été lavés 3 fois par transfert dans des gouttes de 30 μ l de milieu IVF frais sous huile (Figure 40). La pipette de dénudation a été changée entre chaque dilution de cellules leucémiques.

L'opération a été répétée jusqu'au prélèvement de tous les follicules (minimum 3 fois), sans dépasser 2 heures pour éviter la formation d'amas de follicules.

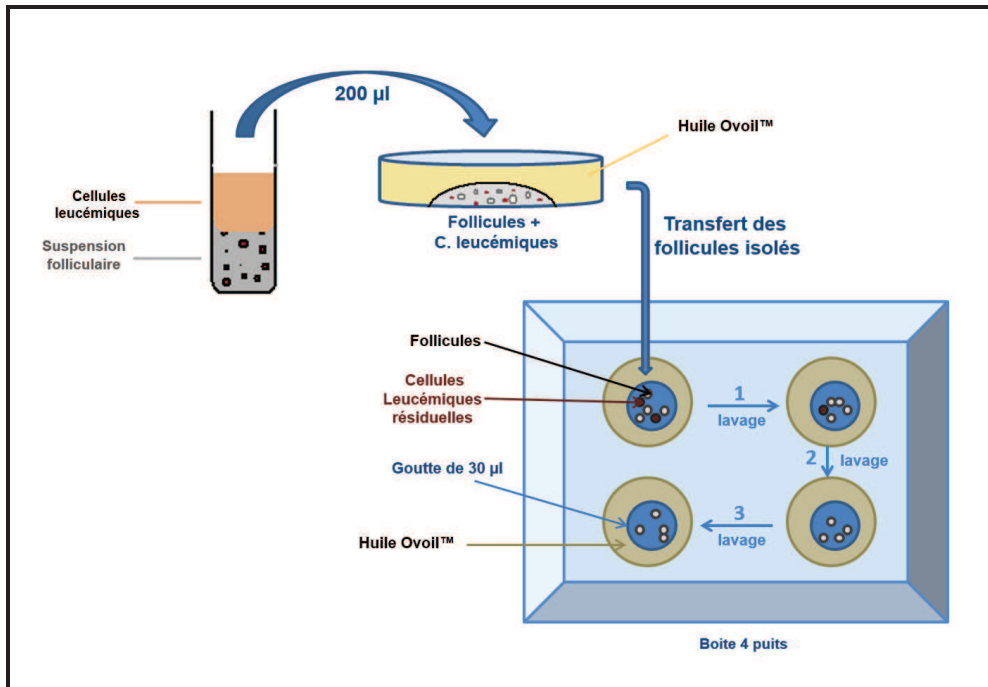


Figure 40. Schéma représentant les étapes utilisées pour l'isolement de follicules primordiaux.

Dans chaque groupe, les follicules isolés ont été comptés, sur des images réalisées sous un champ à fond clair avec un objectif à contraste de phase à modulation d'Hoffman (Nikon, France), à l'aide du système d'acquisition d'images (Fertimorph™) sur un poste de micromanipulation (Research Instrument, France).

Pour chaque dilution de cellules leucémiques, la première et la dernière goutte de lavage ont été respectivement transférées dans un tube eppendorf de 0,5 ml complété jusqu'à 100 µl avec du RPMI + 20 % SVF (Figure 41). Enfin, ces tubes ont été transportés dans de la glace, jusqu'au laboratoire de l'Établissement Français du Sang, pour analyse par cytométrie en flux multicouleurs.

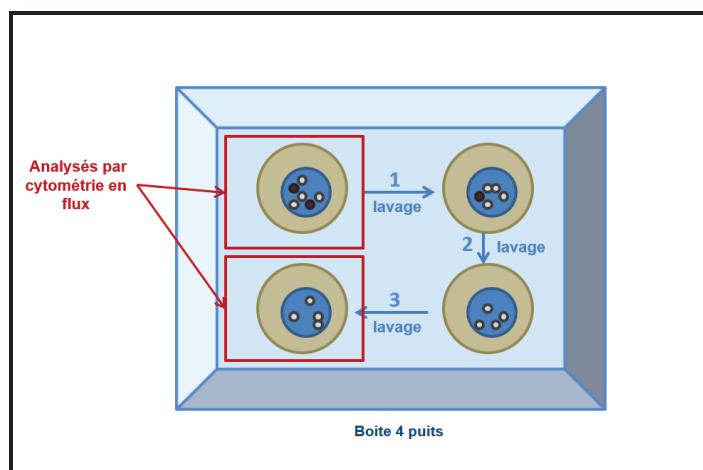


Figure 41. Schéma représentant les éléments sélectionnés pour être analysés par cytométrie en flux.

3. Culture *in vitro* de follicules ovariens isolés

3.1. Formation du gel de fibrine

L'Evicel® est un kit pour colle de fibrine composé de 2 solutions, utilisé en chirurgie et approuvé pour son utilisation clinique (Ethicon, France). Le premier composant correspond à du fibrinogène sous forme liquide à une concentration de 50-90 mg/ml. Le deuxième composé correspond à de la thrombine sous forme liquide à une concentration de 800-1200 IU/ml. La concentration moyenne en fibrinogène dans un flacon est estimée à 70 mg/ml et celle en thrombine à 1000 IU/ml.

Pour nos expériences, l'Evicel® a été décongelé puis laissé à +4° C jusqu'à la première utilisation. D'après la littérature, un gel de fibrine constitué de 12,5 mg/ml de fibrinogène et 1 UI/ml de thrombine (F12,5/T1) offrirait une meilleure reproductibilité et favoriserait une meilleure survie et une meilleure prolifération des cellules stromales humaines (Chiti *et coll.*, 2016; Luyckx *et coll.*, 2014; Luyckx *et coll.*, 2013; Soares *et coll.*, 2015c). Une version modifiée, consistant en un gel plus concentré contenant 50 mg/ml de fibrinogène et 10 UI/ml de thrombine, a par la suite été utilisé dans une étude de Paulini *et coll.*, et a favorisé la survie et prolifération de follicules ovariens humains, principalement des follicules secondaires (Paulini *et coll.*, 2016). Ces deux conditions ont donc été utilisées pour la formation de gels de fibrine.

Le fibrinogène et la thrombine ont été dilués dans du MEM seul (Sigma Aldrich, France) afin d'obtenir les concentrations finales souhaitées. Les solutions diluées n'ont jamais été conservées plus de 24 heures à +4° C.

La veille, les deux composants ont donc été placés au réfrigérateur à +4° C pour la décongélation. Des boîtes 4 puits (Nunc™, ThermoFisher Scientific, France) ont été coatées avec de l'agarose 4 % (SeaKem® LE Agarose, Lonza, France), préalablement reconstitué avec de l'eau distillée, afin de réduire l'adhérence des gels au puits.

Le lendemain, les composants ont été placés dans un contenant propre, dans lequel de la glace a préalablement été placée, sous un poste de sécurité microbiologique. Les composants n'ont jamais été sortis de la glace. Pour les dilutions, les solutions ont été prélevées avec deux seringues distinctes puis placées dans des tubes Falcon, toujours à +4° C, puis le volume approprié de MEM a été rajouté. Une plaque de glace a été sortie au dernier moment et placée sous la hotte.

Une goutte de 15 µl de solution de fibrinogène dilué a délicatement été placé dans un puits d'une boîte 4 puits, puis les follicules ovariens précédemment lavés ont été injectés dans la goutte de fibrinogène sous une loupe. Par la suite, 15 µl de solution de thrombine diluée ont été ajoutés pour former une goutte finale de 30 µl. La goutte de 30 µl de fibrine a rapidement été homogénéisée par pipetages successifs avant polymérisation du gel. Afin d'obtenir une polymérisation complète, la boîte contenant la goutte de 30 µl de fibrine a été placée dans l'étuve à +37° C durant 45 minutes.

3.2. Culture *in vitro*

Le milieu de culture a été utilisé en tenant compte des principales publications relatant les différentes conditions de culture utilisées sur les follicules ovariens isolés dans des modèles animaux et chez l'Homme (Camboni *et coll.*, 2013; Laronda *et coll.*, 2014; Xu *et coll.*, 2013). Un volume finale de 10 ml de milieu MEM (Sigma Aldrich, France) additionné de 10 % de sérum humain AB décomplémenté et de 1 % de solution ITS® (10 µg/ml d'insuline, 5,5 µg/ml de transferrine, 5 ng/ml de sodium sélénite; Sigma Aldrich, France) a été préparé et stocké à +37° C jusqu'à utilisation.

Les gels de fibrine obtenus ont été immergés dans le milieu MEM supplémenté avec 10 % de sérum AB et 1 % ITS, et placés dans l'étuve à +37° C/5 % CO₂ durant 3 jours. La moitié du milieu de culture a été changée au deuxième jour de culture avec du nouveau milieu de culture préchauffé dans l'étuve à +37° C/5 % CO₂.

4. Techniques d'analyses et de qualification des follicules isolés

4.1. Classification morphologique des follicules isolés

Les follicules ont été classés, après isolement, selon leur stade de développement (Gougeon and Chainy, 1987), fondé sur la morphologie des cellules de la granulosa:

- stade primordial, lorsque l'ovocyte a été entouré par des cellules de la granulosa aplaties,
- stade primaire, lorsque l'ovocyte a été entouré par une couche de cellules de la granulosa cuboïdes,
- stade secondaire, lorsque l'ovocyte a été entouré par deux ou plusieurs couches de cellules de la granulosa cuboïdes.

4.2. Calcul du diamètre folliculaire

Le plus grand diamètre théorique, calculé à partir des aires des follicules, a été mesuré sur des photos de follicules isolés, en traçant leurs contours à l'aide du logiciel NIS-D 4.00.00 (Nikon, France). Seuls les follicules dont la morphologie caractéristique était identifiable ont été pris en compte pour les calculs. Le diamètre folliculaire a été basé sur une mesure manuelle de l'aire des follicules puis computation du diamètre théorique.

4.3. Evaluation de la viabilité folliculaire

Un test de viabilité, fondé sur la capacité des cellules à devenir fluorescentes après mise en présence de calcéine AM et d'éthidium homodimère-1 (Live/Dead® viability Assay kit for mammalian cells, Life Technologies, France), a été réalisé sur les follicules isolés après dissociation avec la collagénase NB6 de norme GMP. En effet, la calcéine AM non fluorescente est dégradée en calcéine par une estérase non spécifique présente au niveau des membranes des cellules vivantes, et responsable d'une fluorescence uniforme verte (excitation/émission : 495 nm/515 nm). L'activité estérase intracellulaire aspécifique est une caractéristique des cellules vivantes. L'éthidium homodimère-1 pénètre dans les cellules lorsque la membrane plasmique est altérée, les follicules morts ou endommagés émettent alors une fluorescence rouge après exposition à la molécule d'éthidium homodimère-1 (excitation/émission : ~528/~635 nm). Lorsque la membrane est intacte, l'éthidium homodimère-1 est exclu de la cellule. Ainsi, lors de la lecture en microscopie à fluorescence inversée, les cellules vivantes apparaissent vertes tandis que les cellules mortes ou endommagées apparaissent rouges.

La technique de viabilité (Live/Dead® viability Assay kit for mammalian cells) a été utilisée comme décrite par le protocole du fournisseur. Les follicules isolés ont été incubés durant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière, dans une goutte de PBS 1X (Cambrex, Belgique) contenant 4 mmol/l de calcéine AM et 2 mmol/l d'éthidium homodimère-1. Après exposition, les follicules ont été observés au microscope inversé à fluorescence (CKX41, Olympus, France) équipé d'une caméra (Moticam Pro 282S, Motic, Hong Kong).

Afin d'évaluer la viabilité des follicules isolés, la technique de classification décrite par Dolmans *et coll.* a été utilisée (Dolmans *et coll.*, 2006; Martinez-Madrid *et coll.*, 2004). Cette technique permet de séparer les follicules isolés en 4 catégories en fonction du nombre de cellules de la granulosa mortes. Les follicules sont dits :

- V1, soit vivants, lorsque l'ovocyte et toutes les cellules de la granulosa sont vivants,
- V2, soit peu endommagés, lorsque moins de 10 % des cellules de la granulosa sont mortes,
- V3, soit modérément endommagés, lorsque 10 à 50 % des cellules de la granulosa sont mortes,

- V4, soit morts, lorsque l'ovocyte et plus de 50 % des cellules de la granulosa sont morts.

Cette technique de viabilité a été comparée à celle de la coloration au bleu Trypan précédemment codifiée au laboratoire (Fauque *et coll.*, 2007). Le bleu Trypan est un colorant vital qui permet de distinguer les cellules viables des cellules non viables en s'infiltrant dans les membranes plasmiques des cellules mortes ou endommagées, les faisant apparaître en bleu. Le bleu Trypan est toxique, ce qui va donc induire la mort des follicules isolés lors d'une exposition trop longue, les rendant donc tous bleus.

Les follicules isolés ont été placés dans une goutte sous huile de 30 µl contenant 0,4 % de solution de bleu Trypan (Sigma Aldrich, France), durant 10 minutes. Puis 5 % de sérum humain AB décomplémenté a été ajouté à la solution de 0,4 % de bleu Trypan afin d'inhiber l'effet toxique du bleu Trypan sur les follicules isolés. Les follicules morts ont été colorés en bleu, et les follicules vivants étaient incolores.

4.4. Cytométrie en flux

Au total, 8 marquages ont été réalisés par cytométrie en flux :

- un tube pour le premier milieu de lavage pour les trois niveaux de dilution (3 tubes au total),
- un tube pour le dernier milieu de lavage pour les trois niveaux de dilution (3 tubes au total),
- un tube avec les blastes LAL-B décongelés (contrôle positif),
- un tube avec la suspension ovarienne restante (pas d'ajout de cellules leucémiques ; contrôle négatif).

L'analyse par cytométrie en flux a été effectuée à l'aide du cytomètre FACSCanto II™ et du logiciel d'analyse FACSDiva™ version 6.1.3 (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA). La matrice de compensation a été mise au point avec des billes de comptage selon le protocole du fournisseur (compbeads©, BD Biosciences).

La stratégie d'analyse des échantillons ou « gating strategy » utilisée est basée sur les précédents articles de l'équipe de recherche (Zver *et coll.*, 2014; Zver *et coll.*, 2015; Zver *et coll.*, 2017). Deux marqueurs ont été utilisés afin d'analyser uniquement les cellules nucléées vivantes. En effet, le SYTO13 (Invitrogen, France) est un marqueur d'acides nucléiques, tandis que le 7-AAD (Beckman Coulter, Roissy, France) est un marqueur ayant la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN double brin lorsque la membrane cellulaire est altérée. Ce double marquage, associé au CD45 (horizon 500, HI30; BD Biosciences) permettant d'exclure les lymphocytes, a permis d'isoler les cellules nucléées vivantes (SYTO13⁺/7-AAD⁻/CD45_{low}) parmi la population de cellules ovariennes, et ainsi de déterminer la viabilité cellulaire. Le marquage CD3⁺ (horizon 450; UCHT1; BD Biosciences) a également permis de caractériser les cellules hématopoïétiques (CD45⁺/CD3⁺) présentes au sein de la suspension ovarienne.

Le panel d'anticorps qui a été utilisé pour nos expériences correspond aux anticorps monoclonaux exprimés pas les cellules leucémiques d'immunophénotype connu. Les mêmes panels d'anticorps ont été utilisés pour les trois niveaux de dilution de cellules leucémiques, à chaque expérience. Les anticorps suivants ont été utilisés:

- la phycoérythrine (PE) anti CD33 (P67.6; BD Biosciences), anti CD44 (515; BD Biosciences), anti CD58 (AICD58; Beckman Coulter) ou anti CD361 (MEM-216; Exbio),
- l'allophycocyanine (APC) anti CD10 (HI10A; Beckman Coulter), anti CLEC 12A (50C1; BD Biosciences) ou CD117 (104D2; BD Biosciences),
- l'allophycocyanine H7 (APC-H7) anti CD43 (1G10; BD Biosciences) ou anti HLA-DR (G46-6; BD Biosciences),
- la phycoérythrine-cyanine (PC7) anti CD19 (J3.119; Beckman Coulter) ou anti CD34 (581; Beckman Coulter),
- le V450 et le violet brillant 421 anti CD38 (HB7; BD Biosciences).

Après incubation pendant 20 minutes à +4° C, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et centrifugées pendant 2 min à 3000 tours/min. Le surnageant a ensuite été éliminé, le culot cellulaire a été remis en suspension dans 100 µl de PBS 1X, et les préparations ont ensuite été analysés au cytomètre de flux.

Une population cellulaire anormale est définie comme étant un groupe homogène d'au moins 20 évènements exprimant le même LAIP que les cellules leucémiques au diagnostic (Campana and Coustan-Smith, 1999).

De ce fait, lorsque plus de 20 cellules leucémiques sont détectées par CFM, la suspension analysée est considérée comme positive. Tandis que si moins de 20 cellules leucémiques sont détectées, la suspension est considérée comme négative.

4.5. Examens histologiques

Les fragments de cortex ovarien décongelés et les gels de fibrine ont été fixés durant 24 heures dans du liquide de Bouin pour les colorations ou dans du formol 4 % pour les immunomarquages. Ils ont ensuite été inclus en paraffine et coupés en sections de 7 μm à l'aide d'un microtome (Microm HM 340-E, Microm Microtech, France). Toute les 5 à 10 sections, des coupes ont été déparaffinées puis colorées au Trichrome de Masson (Hémalun de Mayer - Fuschine Ponceau - Vert lumière ; RAL Diagnostic, France) ou à l'hématoxyline-éosine (RAL Diagnostic, France) afin d'être observées au microscope (Nikon Eclipses Ci, Nikon, France). Les photos ont été réalisées à l'aide du logiciel NIS-D 4.00.00 (Nikon, France).

4.6. Immunomarquage

L'immunomarquage a été effectué sur des coupes déparaffinées de matrices de fibrine contenant des follicules isolés. L'antigène Ki-67 est un marqueur de prolifération, en effet sa présence au niveau nucléaire est caractéristique des cellules prolifératives. Un anticorps de lapin anti-Ki-67 humain (dilution 1/400, ref. RM-9106-S, ThermoFisher Scientific, France) a été utilisé comme anticorps primaire, tandis qu'un anticorps de souris anti-lapin a été utilisé comme anticorps secondaire. Une coupe de thymus fœtal a été utilisée comme contrôle positif, tandis qu'une coupe sans mise en contact avec l'anticorps primaire a été utilisée comme contrôle négatif. Le marquage a été révélé par une coloration marron, et les lames ont été contremarquées avec du bleu d'aniline (ThermoFisher Scientific, France). Les marquages ont été réalisés par le service d'anatomie et cytologie pathologique (CHRU de Besançon). Les follicules peuvent être classés en deux catégories en fonction l'expression ou non de Ki-67 ; Ils sont dits « en croissance » quand au moins une cellule de la granulosa est Ki-67 positive, donc de coloration marron. Quand toutes les cellules sont Ki-67 négatives, donc de coloration bleue, ils ne sont pas considérés comme étant en croissance (Dolmans *et coll.*, 2008).

4.7. Analyses statistiques

Le logiciel Graphpad™ Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques effectuées. Le test *t* de Student a été utilisé pour comparer le nombre moyen de follicules isolés obtenus avec la collagénase IA, la collagénase NB6 et la libérase DH. Pour la comparaison des diamètres des follicules isolés après dissociation des fragments de cortex ovarien, ainsi que la comparaison des diamètres moyens des follicules isolés avant et après culture *in vitro* dans des gels de fibrine, le test Mann Whitney a été utilisé. Enfin, l'évaluation de la comparaison du nombre de follicules isolés vivants, obtenus après dissociation avec les collagénases IA, la collagénase NB6 et la libérase DH a été réalisée à l'aide du test du χ^2 . Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque le *p* a été inférieur à 0,05.

RÉSULTATS

1. Evaluation d'une collagénase NB6 de grade GMP, en comparaison à la collagénase IA et à la libérase DH

1.1. Rendement

Nous avons, dans un premier temps, effectué une étude comparative dans le but d'évaluer l'efficacité de la collagénase NB6 de grade GMP par rapport à une collagénase IA utilisée en routine au sein du laboratoire. Au cours de cette étude, 2437 follicules ont pu être isolés après dissociation de 26 fragments de tissu ovarien issus de 13 patientes. Au total, 1361 follicules ont été obtenus avec la collagénase NB6 de grade GMP, ce qui fait en moyenne, 210 ± 205 follicules pour 100 mg de tissu dissocié ($n = 13$). Avec la collagénase IA, 1076 follicules ont été isolés, soit en moyenne 127 ± 99 follicules pour 100 mg de tissu dissocié ($n = 13$). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux enzymes en termes de rendement, la collagénase NB6 de grade GMP permettrait donc une dissociation similaire à la technique précédemment codifiée au sein du laboratoire ($p = 0,171$).

Nous avons par la suite comparé les rendements obtenus après dissociation avec la collagénase IA, la collagénase NB6, et la libérase DH qui est actuellement l'enzyme de référence pour l'isolement de follicules ovariens humains. Au total, 532 follicules ont été isolés avec la collagénase NB6 pour ces expériences complémentaires, soit en moyenne 106 ± 97 follicules pour 100 mg de tissu ($n = 5$). Avec la collagénase IA, 406 follicules ont été isolés, soit en moyenne 81 ± 68 follicules pour 100 mg de tissu ($n = 5$). Après utilisation de la libérase DH, 327 follicules ont été recueillis, soit en moyenne 65 ± 95 follicules pour 100 mg de tissu ($n = 5$). Aucune différence significative n'a été observée entre les trois enzymes en termes de rendement ($p = 0,386$ pour la libérase DH en comparaison à la collagénase NB6, et $p = 0,720$ pour la comparaison entre la libérase DH et la collagénase IA).

1.2. Classification folliculaire

Les follicules préalablement isolés ont été classés en fonction de leur stade après dissociation avec trois enzymes différentes de fragments de cortex ovarien provenant d'une même patiente. La majorité des follicules isolés étaient des follicules primordiaux, quelle que soit l'enzyme utilisée. En effet, le pourcentage de follicules primordiaux a été de 77,5 % ($n = 247/319$) avec la collagénase IA, de 83,7 % ($n = 303/362$) avec la collagénase NB6 et de 75,1 % ($n = 154/205$) après utilisation de la libérase DH (Tableau 6).

	Follicules (n)	Primordiaux n (%)	Primaires n (%)	Secondaires n (%)
Collagénase IA (200 IU/ml)	319	247 (77,5)	55 (17,2)	17 (5,3)
Collagénase NB6 (200 IU/ml)	362	303 (83,7)	48 (13,3)	11 (3)
Libérase DH (0,28 Wunsch U/ml)	205	154 (75,1)	30 (14,6)	21 (10,3)

% = pourcentage de chaque stade folliculaire en fonction du nombre total de follicules isolés.

Tableau 6. Classification des follicules en fonction du stade pour chaque protocole de dissociation enzymatique de fragments de tissu ovarien cryoconservés.

1.3. Morphologie

Le plus grand diamètre de 781 follicules isolés a été mesuré après dissociation avec la collagénase NB6 de grade GMP, la collagénase IA et la libérase DH. Le diamètre moyen des follicules obtenus après dissociation avec la collagénase NB6 de grade GMP a été de $31,66 \pm 6,79 \mu\text{m}$ (n = 317 follicules), tandis qu'il a été de $36,77 \pm 7,69 \mu\text{m}$ (n = 273 follicules) avec la collagénase IA et de $45,21 \pm 8,26 \mu\text{m}$ avec la libérase DH (n = 191 follicules).

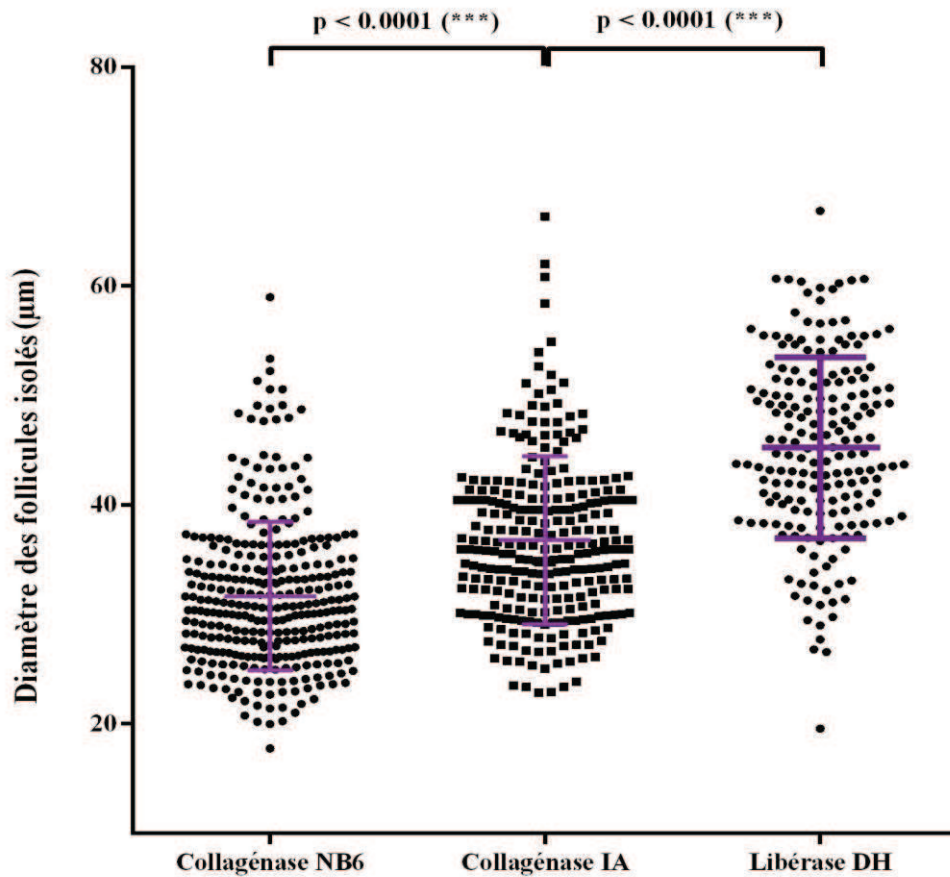


Figure 42. Diamètre des follicules isolés avec respectivement la collagénase NB6 de grade GMP, la collagénase IA et la libérase DH (µm); Chaque point ou carré représente un follicule analysé; *** = différence statistiquement significative.

Les follicules isolés avec la collagénase NB6 avaient des diamètres significativement inférieurs à ceux obtenus avec la collagénase IA ($p < 0,0001$) et la libérase DH ($p < 0,0001$) (Figure 42). En effet, 95 % des follicules isolés avec la collagénases NB6 de grade GMP avaient un diamètre moyen inférieur à 45 µm, tandis que 87 % des follicules avaient un diamètre moyen inférieur à 45 µm avec la collagénase IA et seuls 50 % des follicules avaient un diamètre moyen inférieur à 45 µm avec la libérase DH.

1.4. Viabilité

Sur les 76 follicules analysés, 92 % (68/76 follicules) ont été classés de manière similaire avec les deux techniques : les follicules vivants étant non-colorés ou classés soit V1 soit V2, les follicules morts étant colorés en bleu ou classés soit V3 soit V4 (Figure 43). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les deux techniques ($p > 0,99$). Pour toutes les expériences d'évaluation de la viabilité, la technique utilisant la calcéine AM et l'éthidium homodimère-1 a donc été utilisée.

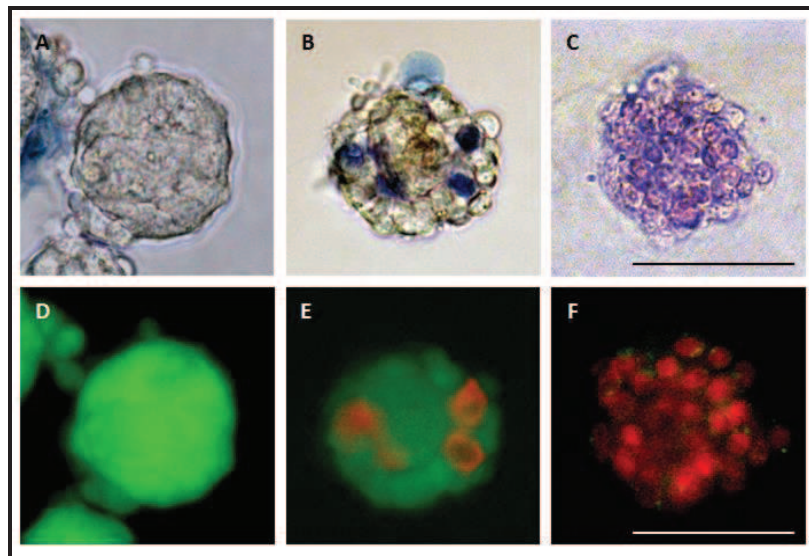


Figure 43. Photos de la classification des follicules isolés en fonction du nombre des cellules de la granulosa mortes. Follicules vivants dit V1 après coloration au bleu Trypan (A) et après test de viabilité Calcéine AM/Ethidium homodimère-1(D). Follicules peu endommagés dit V2 après coloration au bleu Trypan (B) et après test de viabilité Calcéine AM/Ethidium homodimère-1(E). Follicules morts dit V4 après coloration au bleu Trypan (C) et après test de viabilité Calcéine AM/Ethidium homodimère-1(F). Barre d'échelle = 40 μ m.

Après dissociation avec la collagénase NB6 de grade GMP, 93,4 % des follicules isolés étaient vivants (V1) ou très peu endommagés (V2) ($n = 254/272$ follicules analysés). Le taux de survie (V1+V2) des follicules isolés a été de 92,6 % après dissociation avec la collagénase IA ($n = 276/298$ follicules analysés). Ce taux a été de 94,9 % avec la libérase DH ($n = 188/198$ follicules analysés) (Tableau 7).

Aucune différence significative n'a été observée, en termes de viabilité, entre les trois enzymes ($p = 0,959$ pour la comparaison de la viabilité entre la collagénase NB6 et la collagénase IA; $p = 0,877$ pour la comparaison de la viabilité entre la collagénase NB6 et la libérase DH; $p = 0,728$ pour la comparaison de la viabilité entre la libérase DH et la collagénase IA).

	Follicules (n)	V1	V2	V3	V4	Pourcentage de viabilité
Collagénase IA (200 IU/ml)	298	191	85	17	5	92,6 %
Collagénase NB6 (200 IU/ml)	272	194	60	14	4	93,4 %
Libérase DH (0,28 Wunsch U/ml)	198	145	43	10	0	94,9 %

Tableau 7. Viabilité des follicules isolés, de V1 à V4, en fonction du nombre de cellules de la granulosa endommagées, après dissociation de fragments de tissu ovarien cryoconservés avec une collagénase IA (n = 7 fragments de patientes), une collagénase NB6 de grade GMP (n = 6 fragments de patientes), et une libérase DH (n = 5 fragments de patientes).

Les trois enzymes ont permis d'obtenir la survie de la majeure partie des follicules isolés, toutefois la dissociation des fragments de cortex ovariens semblait être plus « propre » avec la collagénase de grade GMP (Figure 44 B) et avec la libérase DH. En effet, un nombre plus important de débris a été observé après utilisation de la collagénase IA (Figure 44 A).

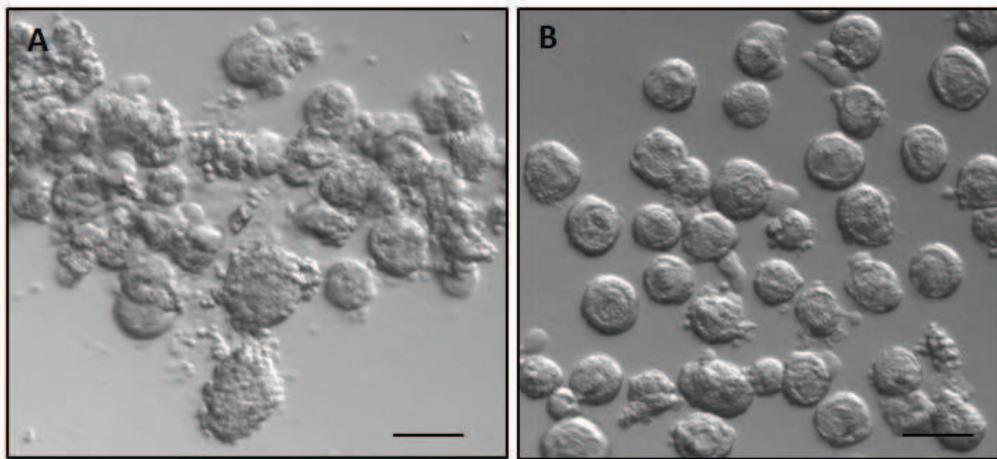


Figure 44. Photos de suspensions folliculaires sous un microscope inversé. A. Suspension folliculaire obtenue après dissociation de fragments de cortex ovarien cryoconservés avec une collagénase IA. B. Suspension folliculaire obtenue après dissociation de fragments de cortex ovarien cryoconservés avec une collagénase NB6 de grade GMP. Barre d'échelle = 50 μ m.

Cette observation a été confirmée par l'étude de la viabilité cellulaire. Un nombre plus important de débris (fluorescence rouge) qui s'agrègent, formant des amas qui se collent aux follicules, ont pu être observés après utilisation de la collagénase IA (Figure 45 C-F), contrairement à la collagénase NB6 (Figure 45 A-D) et la libérase DH (Figure 45 B-E).

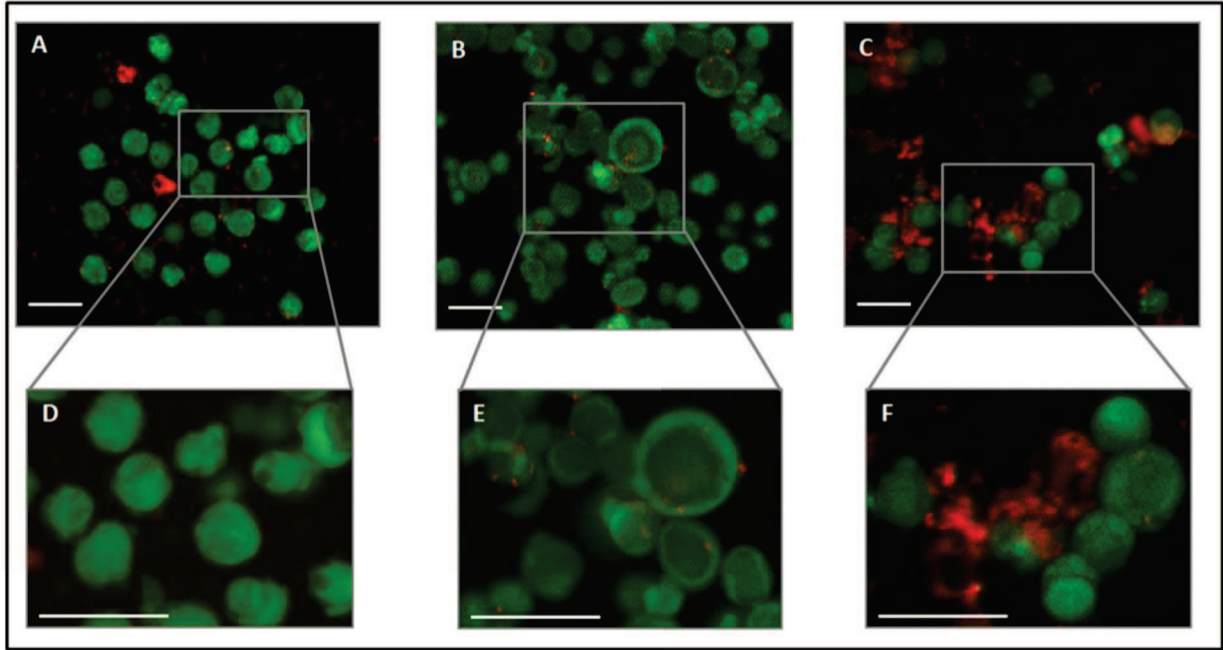


Figure 45. Photos montrant la viabilité des follicules isolés après dissociation avec la collagénase NB6 de grade GMP (Figure A-D), la libérase DH (Figure B-E) et la collagénase IA (Figure C-F). Les cellules mortes ou endommagées émettent une fluorescence rouge (éthidium homodimère-1), tandis que les cellules vivantes émettent une fluorescence verte (calcéine AM). Barre d'échelle = 100 μ m.

La collagénase NB6 de grade GMP a été utilisée pour toutes les expériences réalisées par la suite, de par son caractère clinique et au vu des résultats obtenus précédemment.

2. Evaluation des stratégies de réutilisation des follicules isolés

2.1. Décellularisation de fragments de cortex ovarien cryoconservés

Après traitement au SDS 0,1 % des fragments corticaux, aucun noyau n'a été retrouvé après coloration au trichrome de Masson (Figure 46 B). Ceci a été confirmé par l'utilisation du DAPI qui permet de voir les noyaux cellulaires par une fluorescence bleue. La fluorescence d'intensité faible pouvant être aperçue avec le DAPI même après décellularisation correspondrait vraisemblablement à du bruit de fond (Figure 46 C et D).

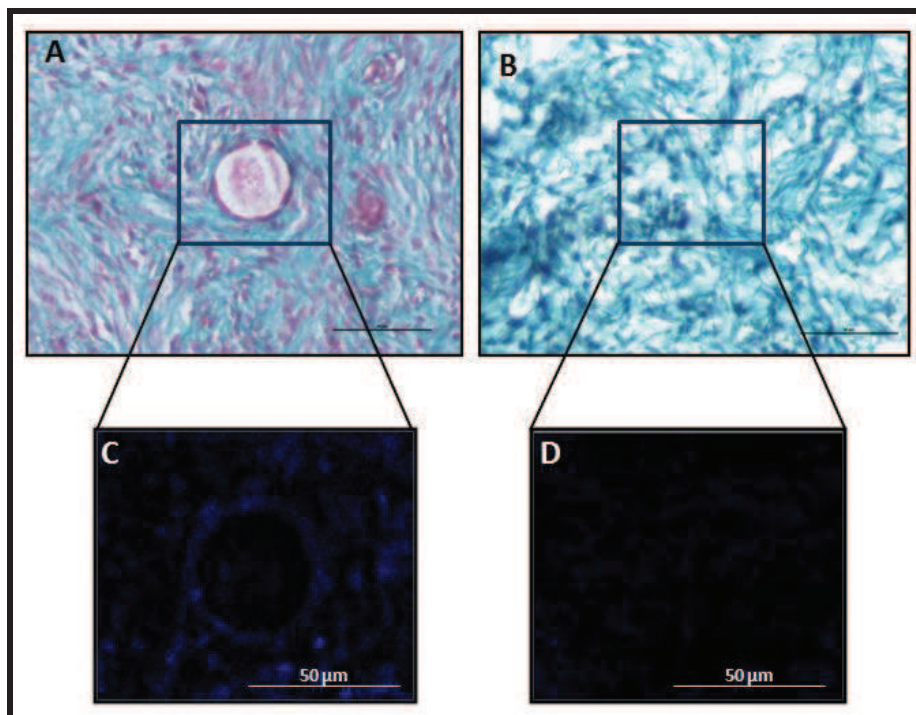


Figure 46. Coupes histologiques de fragments de cortex ovarien cryoconservés. Fragment de cortex ovarien non décellularisé après coloration au trichrome de Masson (A) et après coloration nucléaire au DAPI (C) (contrôle positif). Fragment de cortex ovarien décellularisé après coloration au trichrome de Masson (B) et après coloration nucléaire au DAPI (D).

Seule la matrice extracellulaire a été conservée après traitement avec le SDS 0,1 %.

Cependant, la structure même de la matrice semble altérée, avec des fibres conjonctives plus lâches et moins ordonnées que lorsque les fragments de cortex ovariens n'étaient pas traités (Figure 46 A et B).

2.2. Culture *in vitro* dans un gel de fibrine

2.2.1. Concentration et maniabilité du gel de fibrine

Dans un premier temps, des gels de fibrine de concentrations faibles ont été testés en se basant sur les données de la littérature. La polymérisation de ces gels composés de 12,5 mg/ml de fibrinogène et 1 UI/ml de thrombine a été incomplète. En effet, la prise de ces gels à l'aide d'une pince a été difficile. Aussi, une fuite des follicules ensemencés a été observée, la majorité du gel étant resté liquide (Figure 47 A).

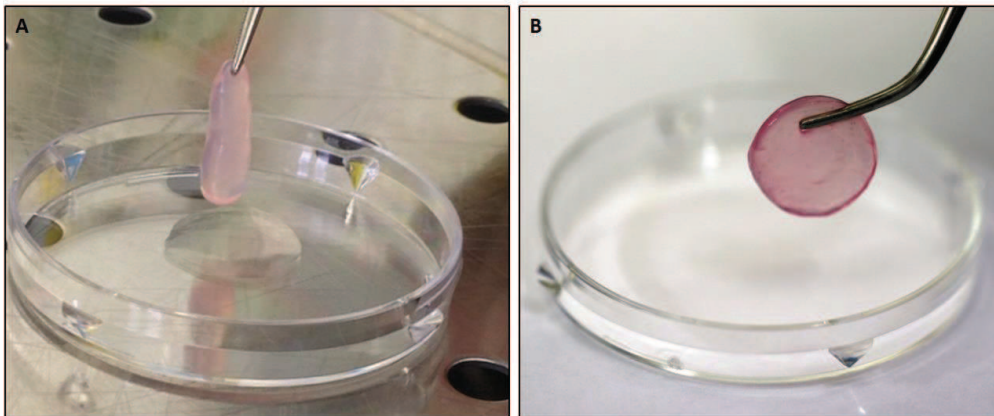


Figure 47. Photos d'un gel de fibrine de concentrations F12,5/T1(A) et de concentration F50/T10 (B).

Un deuxième type de gel a donc été utilisé, cette fois à des concentrations plus élevées: 50 mg/ml de fibrinogène et 10 UI/ml de thrombine. A ces concentrations, la polymérisation a été complète et les gels ainsi obtenus ont permis un ensemencement sans perte des follicules. La prise des gels à l'aide d'une pince a été facile, permettant ainsi un éventuel transport dans un bloc opératoire (Figure 47 B).

Les follicules ont été complètement intégrés au gel de fibrine F50/T10 après polymérisation (J0), aucune démarcation n'a été observée, quel que soit le stade folliculaire (Figure 48).

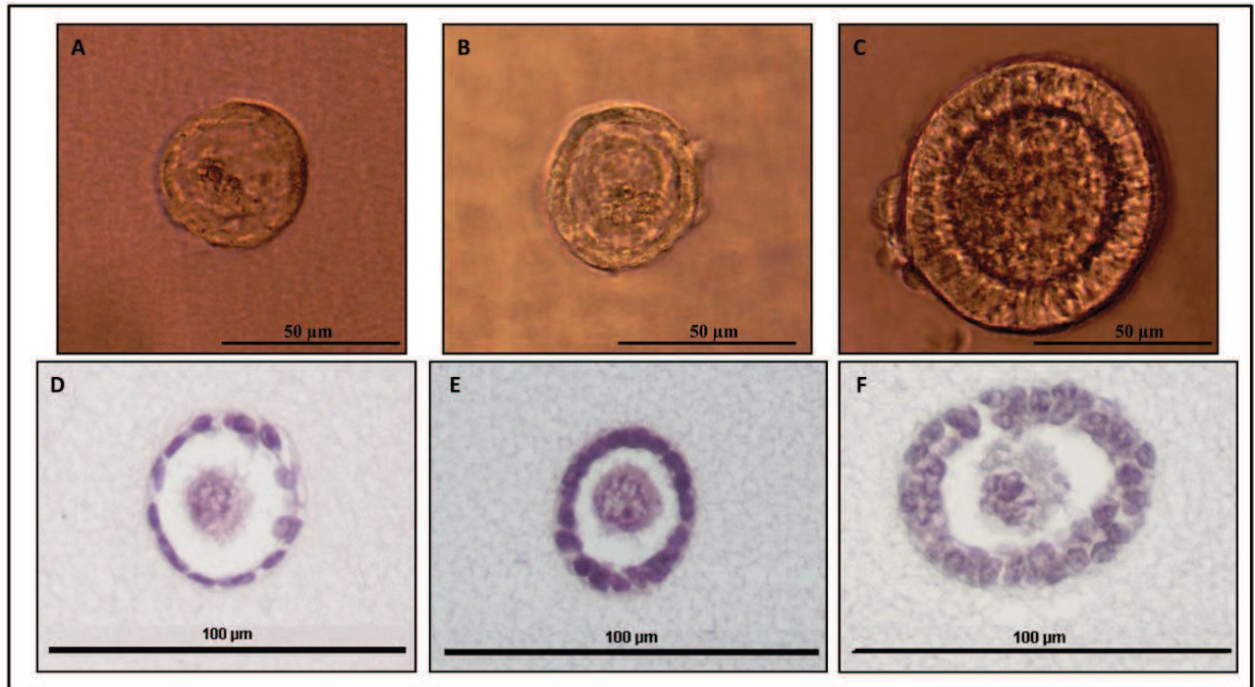


Figure 48. Photos de follicules isolés ensemencés dans un gel de fibrine F50/T10 après polymérisation (J0). Follicules primordial (A), primaire (B) et secondaire (C) dans du milieu de culture observés sous un champ lumineux. Follicules primordial (D), primaire (E) et secondaire (F) observés après coloration à l'hématoxyline-éosine.

2.2.2. Dégradation du gel de fibrine

Après trois jours de culture *in vitro* des follicules dans les gels de fibrine (J3), une dégradation progressive des gels a été observée quel que soit le stade folliculaire. Cette dégradation n'a été constatée qu'au niveau des follicules, formant une sorte de halo les entourant complètement. Au-delà de trois jours, ce halo était devenu plus grand et une perte importante des follicules a été constatée après changement du milieu de culture (Figure 49).

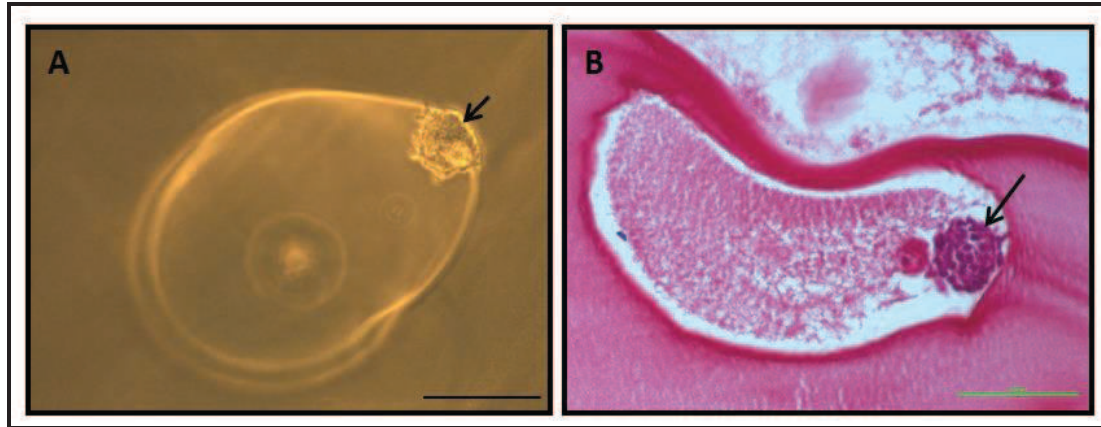


Figure 49. Photos de follicules isolés ensemencés dans un gel de fibrine F50/T10 après 3 jours de culture *in vitro* (J3).
A. Follicule au sein d'un gel immergé dans du milieu de culture observés sous un champ lumineux. **B.** Coupe d'un follicule au sein d'un gel après coloration à l'hématoxyline-éosine. Les flèches montrent les follicules. Barre d'échelle = 100 μm .

2.2.3. Viabilité

Afin d'évaluer l'effet d'une culture *in vitro* sur les follicules isolés avec la collagénase NB6 de grade GMP, l'analyse de la viabilité a été effectuée à J3. En effet, après trois jours de culture *in vitro*, 90,7 % des follicules isolés étaient vivants (75,5 % de V1) ou très peu endommagés (15,2 % de V2) ($n = 307/339$ follicules analysés), ce qui est proche des résultats obtenus juste après isolement. Seuls 2 % des follicules ont été retrouvés morts dans le gel de fibrine sur les 339 follicules analysés (7/339 follicules analysés) (Tableau 8).

Nombre de gels de fibrine (n = 9)	J3				Pourcentage de viabilité
	V1	V2	V3	V4	
1	10	1	0	0	100 %
2	35	5	2	1	93 %
3	25	7	5	2	82 %
4	24	5	3	2	85,3 %
5	18	11	3	1	87,9 %
6	46	8	2	0	96,4 %
7	38	7	1	0	97,8%
8	33	2	2	1	92,1%
9	27	5	7	0	82 %
Total	256	51	25	7	90,7 %

Tableau 8. Viabilité des follicules isolés, de V1 à V4, en fonction du nombre de cellules de la granulosa endommagées, après 3 jours de culture *in vitro* (n = 9 gels de fibrine).

2.2.4. Diamètre des follicules avant et après 3 jours de culture *in vitro*

Dans le but d'évaluer la croissance des follicules ensemencés dans des gels de fibrine après culture *in vitro*, le plus grand diamètre de 716 follicules isolés a été mesuré. Le diamètre moyen des follicules obtenus à J0 a été de $47,64 \pm 5,99 \mu\text{m}$ (n = 453 follicules, dans 9 gels de fibrine analysés). A J3, le diamètre moyen des follicules ensemencés dans les gels de fibrine a augmenté de manière significative, passant à $55,64 \pm 9,89 \mu\text{m}$ (n = 263 follicules, dans 9 gels de fibrine analysés) (p = 0,029).

Après trois jours de culture *in vitro*, deux populations significativement distinctes ont été observées (p < 0,0001). Parmi les follicules cultivés, 37,6 % (diamètre moyen = $30,15 \pm 5,02$; n = 99/263 follicules) ont eu un diamètre inférieur ou égal à $42 \mu\text{m}$, tandis que 62,4 % (diamètre moyen = $63,11 \pm 18,78$; n = 164/263 follicules) ont eu un diamètre supérieur à $42 \mu\text{m}$ (Figure 50).

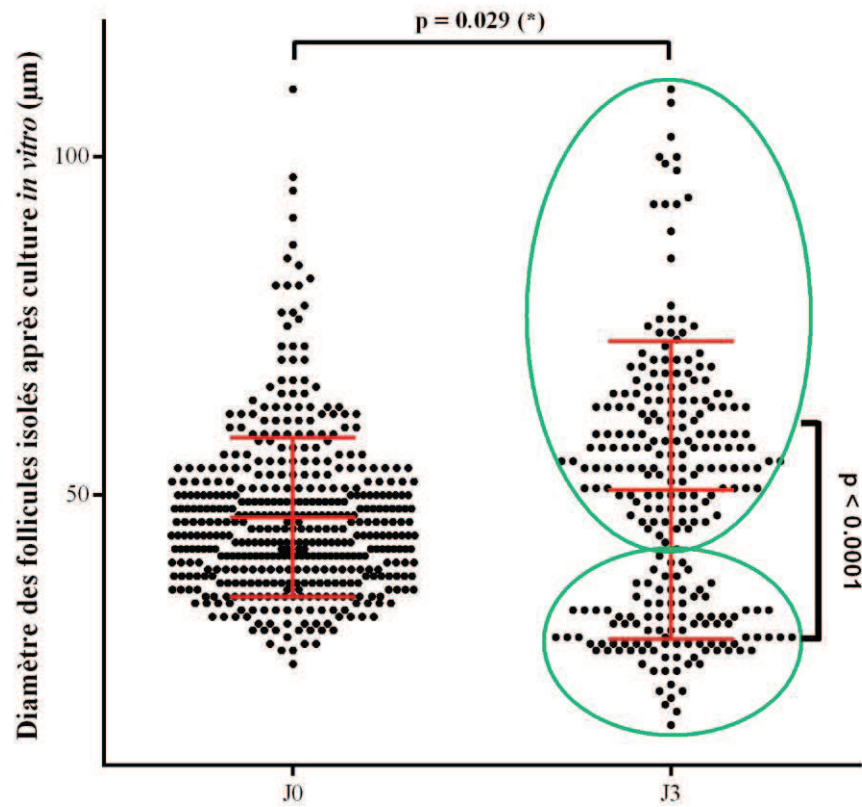


Figure 50. Diamètre des follicules dans un gel de fibrine avant (J0) et après trois jours (J3) de culture *in vitro* (µm). Chaque point représente un follicule analysé. * = différence statistiquement significative.

2.2.5. Etude de l'état prolifératif des follicules isolés avant et après culture *in vitro*

Nous avons voulu évaluer l'état d'activation des follicules isolés après dissociation des fragments de cortex ovariens avec la collagénase NB6 de grade GMP.

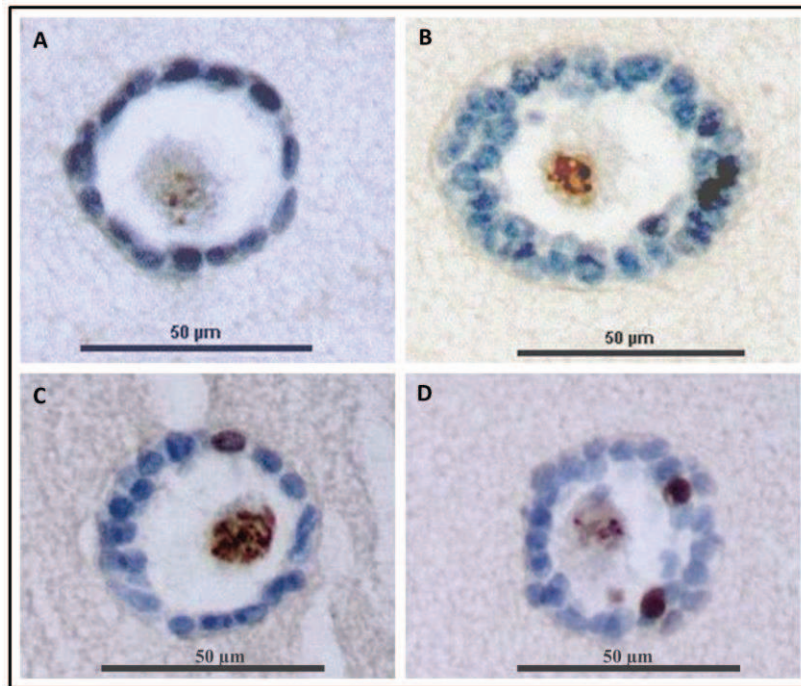


Figure 51. Coupe après analyse immunocytochimique de follicules isolés ensemencés dans un gel de fibrine F50/T10. A. Follicule primordial Ki67-négatif (cellules colorées en bleu). B. Follicule secondaire Ki67-négatif (cellules colorées en bleu). C. Follicule primaire avec une cellule Ki67-positif (cellule colorée en marron). D. Follicule secondaire avec deux cellules Ki67-positives (cellules colorées en marron).

Juste après leur isolement avec la collagénase NB6 de grade GMP, $29 \pm 9,19\%$ ($n = 9/31$ follicules analysés) des follicules ont été Ki67-positifs donc en croissance. Parmi ceux-ci, $23 \pm 1,43\%$ étaient des follicules secondaires ($n = 7/12$ follicules secondaires analysés) et $6 \pm 6,36\%$ étaient des follicules primaires ($n = 2/13$ follicules primaires analysés). Aucun follicule primordial n'a été en croissance autrement dit Ki67-positif ($n = 6$ follicules primordiaux analysés) (Figure 51).

Après 3 jours de culture *in vitro*, $45 \pm 1,41\%$ des follicules ensemencés dans un gel de fibrine ont été Ki67-positifs, soit en croissance ($n = 10/22$ follicules analysés). Parmi les follicules Ki67-positifs, $36 \pm 2,83\%$ étaient des follicules secondaires ($n = 8/12$ follicules secondaires analysés), $9 \pm 1,41\%$ étaient des follicules primaires ($n = 2/6$ follicules primaires analysés) et aucun follicule primordial n'a été en croissance autrement dit Ki67-positif ($n = 4$ follicules primordiaux analysés).

3. Purification de cellules leucémiques au sein d'une suspension folliculaire

3.1. Analyse morphologique

Des cellules leucémiques ont été ajoutées en excès dans des suspensions ovariennes issues de la dissociation de fragments de cortex ovariens de patientes saines. Les suspensions de cellules leucémiques ont été utilisées comme contrôle positif. Après trois lavages, peu de cellules leucémiques ont pu être observées sous microscope inversé (Figure 52). La présence de quelques cellules leucémiques ayant adhéré aux follicules isolés a néanmoins été constatée (Figure 52 C).

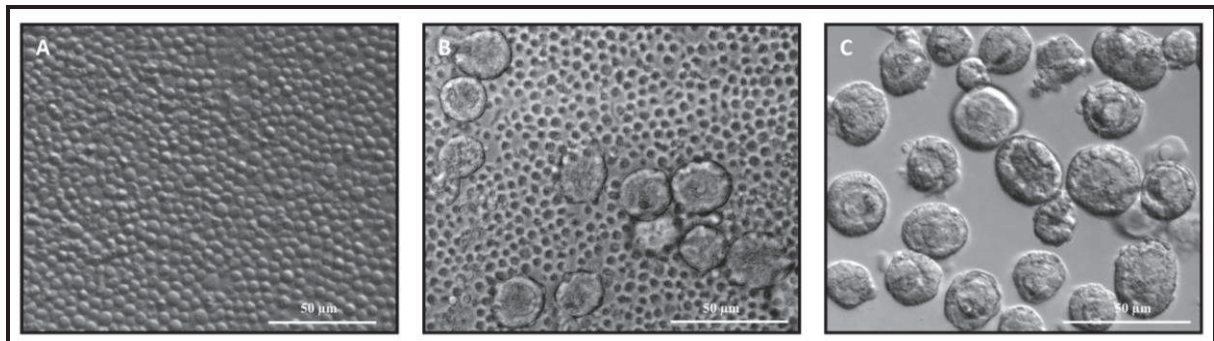


Figure 52. Photos de suspensions cellulaires sous un microscope inversé; A. Cellules leucémiques (contrôle positif). B. Suspension ovarienne contenant des follicules après ajout de cellules leucémiques (sans lavages). C. Suspension ovarienne contenant des follicules isolés après trois lavages.

L'élimination de la majeure partie des cellules leucémiques préalablement ajoutées a été confirmée par fluorescence. Les cellules leucémiques ayant été marquées à l'aide d'un « Cell tracer », leur présence a été facilement identifiable avant et après trois lavages (Figure 53 B et D).

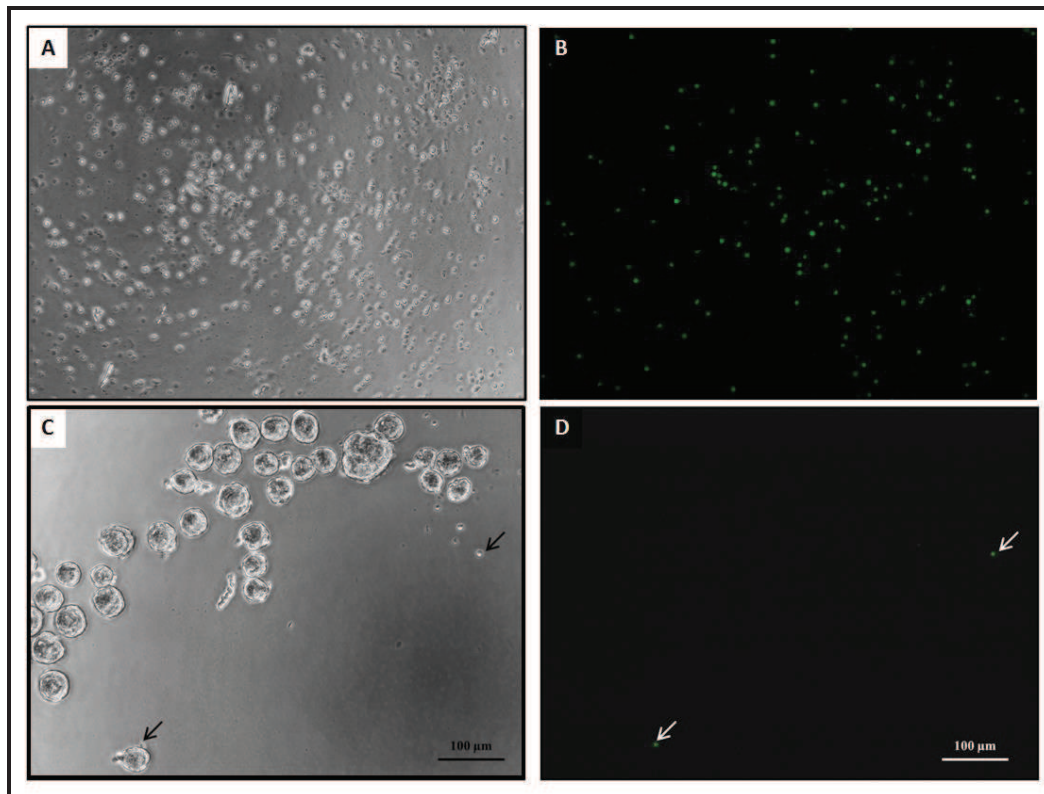


Figure 53. Photos de suspensions cellulaires sous un microscope inversé. A. Cellules leucémiques (contrôle positif). B. La même suspension contenant des cellules leucémiques marquées (fluorescence verte). C. Suspension ovarienne contenant des follicules isolés après trois lavages. D. La même suspension ovarienne contenant des follicules isolés après trois lavages. Les flèches montrent les deux cellules leucémiques marquées, retrouvées après trois lavages.

3.2. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicolours

Le nombre de cellules leucémiques présentes au sein des suspensions ovariennes a été évalué par CFM. Au total, 1068 follicules ont pu être isolés au cours des expériences réalisées. Avant lavages des follicules, 19015 cellules leucémiques (moyenne = 792 ± 1402 ; minimum = 1; maximum = 4889; n = 24 suspensions ovariennes analysées) ont été détectées, tandis que seules 61 cellules leucémiques (moyenne = 3 ± 5 ; minimum = 0; maximum = 22; n = 24 suspensions ovariennes analysées) ont été détectées après trois lavages quel que soit le nombre de cellules préalablement ajouté. Sur ces 24 expériences de purification de cellules leucémiques effectuées par lavages successifs, seule une suspension ovarienne a été considérée comme positive, c'est-à-dire contenant un nombre de cellules leucémiques supérieur à 20 événements détectés par CFM (Tableau 9).

CFM

Patientes	Poids du tissu ovarien décongelé (mg)	Nombre de follicules isolés	Nombre de cellules leucémiques ajoutées	Type de leucémie	Nombre de cellules leucémiques détectées		Résultats	
					Avant lavage	Après 3 lavages	Avant lavage	Après 3 lavages
1	46,2	93	1.10 ⁶	LAL-B	4889	0	POSITIF	NEGATIF
1	46,2	89	1.10 ⁵	LAL-B	452	4	POSITIF	NEGATIF
1	46,2	91	1.10 ⁴	LAL-B	32	0	POSITIF	NEGATIF
2	69,6	4	1.10 ⁶	LAL-B	7	0	NEGATIF	NEGATIF
2	69,6	10	1.10 ⁵	LAL-B	6	0	NEGATIF	NEGATIF
2	69,6	17	1.10 ⁴	LAL-B	1	0	NEGATIF	NEGATIF
3	77	50	1.10 ⁵	LAM	15	3	NEGATIF	NEGATIF
3	77	35	1.10 ⁴	LAM	1	0	NEGATIF	NEGATIF
3	77	31	1.10 ³	LAM	3	0	NEGATIF	NEGATIF
4	70,9	11	1.10 ⁶	LAM	177	4	POSITIF	NEGATIF
4	70,9	5	1.10 ⁵	LAM	11	1	NEGATIF	NEGATIF
4	70,9	3	1.10 ⁴	LAM	3	0	NEGATIF	NEGATIF
5	31,7	47	1.10 ⁶	LAM	3434	22	POSITIF	POSITIF
5	31,7	46	1.10 ⁵	LAM	388	3	POSITIF	NEGATIF
5	31,7	36	1.10 ⁴	LAM	37	2	POSITIF	NEGATIF
6	59,3	88	1.10 ⁶	LAM	3799	6	POSITIF	NEGATIF
6	59,3	96	1.10 ⁵	LAM	1265	3	POSITIF	NEGATIF
6	59,3	65	1.10 ⁴	LAM	36	1	POSITIF	NEGATIF
7	38,6	12	1.10 ⁶	LAM	2069	7	POSITIF	NEGATIF
7	38,6	20	1.10 ⁵	LAM	206	2	POSITIF	NEGATIF
7	38,6	16	1.10 ⁴	LAM	25	2	POSITIF	NEGATIF
8	38,6	63	1.10 ⁶	LAM	1942	1	POSITIF	NEGATIF
8	38,6	68	1.10 ⁵	LAM	202	0	POSITIF	NEGATIF
8	38,6	72	1.10 ⁴	LAM	15	0	NEGATIF	NEGATIF
Total		1068			19015	61		
Moyenne					792	3		
Ecart type					1402	5		
Expériences	24							

Tableau 9. Résultats obtenus par CFM à partir de l'analyse de 24 suspensions ovariennes suite à l'ajout de 10³ à 10⁶ cellules leucémiques, avant et après trois lavages. LAL-B = leucémie aigüe lymphoblastique de type B ; LAM = leucémie aigüe myéloblastique. La seule suspension ovarienne considérée comme positive après trois lavages a été encadrée en rouge.

Après analyse par CFM, les cellules leucémiques ont été facilement identifiables et ont formés une population homogène (Figure 54 A, Figure 55 A, Figure 56 A). Après simple transfert des follicules, sans lavages, le nombre d'évènements détectés par cytométrie en flux correspondant aux cellules leucémiques ajoutées avait déjà diminué par rapport au contrôle positif (Figure 54 B, Figure 55 B, Figure 56 B). Trois lavages ont permis d'obtenir une diminution drastique du nombre d'évènement détecté (Figure 54 C, Figure 55 C, Figure 56 C).

En effet, lorsque 10^6 cellules leucémiques ont été ajoutées aux suspensions ovariennes, une moyenne de 2042 ± 1885 évènements a été détectée avant lavages (minimum = 7; maximum = 4889; n = 8 suspensions ovariennes analysées), alors qu'une moyenne de 5 ± 7 évènements a été détectée après 3 lavages (minimum = 0; maximum = 22; n = 8 suspensions ovariennes analysées) (Figure 54).

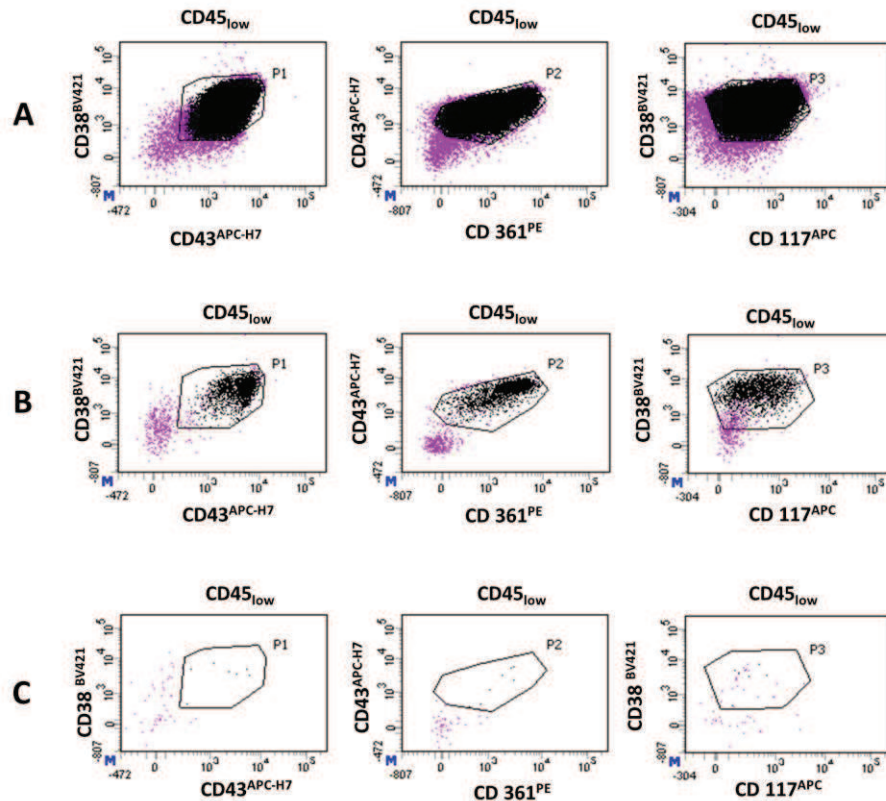


Figure 54. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicolore (CFM) dans des suspensions ovariennes contenant des follicules isolés après ajout de 10^6 cellules leucémiques. Seules les cellules nucléées vivantes (SYTO13⁺/7AAD) CD45_{low} ont été représentées (points violets). Les points noirs représentent les cellules leucémiques détectées par leur immunophénotype caractéristique : CD38⁺/CD43⁺/CD361⁺/CD117⁺ parmi les CD45_{low}. Un évènement positif doit être à l'intersection des populations P1 (CD38 versus CD43), P2 (CD43 versus CD361) et P3 (CD38 versus CD117). A. Contrôle positif (cellules leucémiques). B. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contenant des follicules isolés après ajout de 10^6 cellules leucémiques (n = 2069 évènements détectés). C. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contaminée par 10^6 cellules leucémiques après trois lavages (n = 7 évènements détectés).

Après l'ajout de 10^5 cellules leucémiques dans les suspensions ovariennes, une moyenne de 316 ± 420 évènements a été détectée avant lavages (minimum = 1; maximum = 1265; n = 8 suspensions ovariennes analysées), tandis qu'une moyenne de 2 ± 2 évènements a été détectée après 3 lavages (minimum = 0; maximum = 4; n = 8 suspensions ovariennes analysées) (Figure 55).

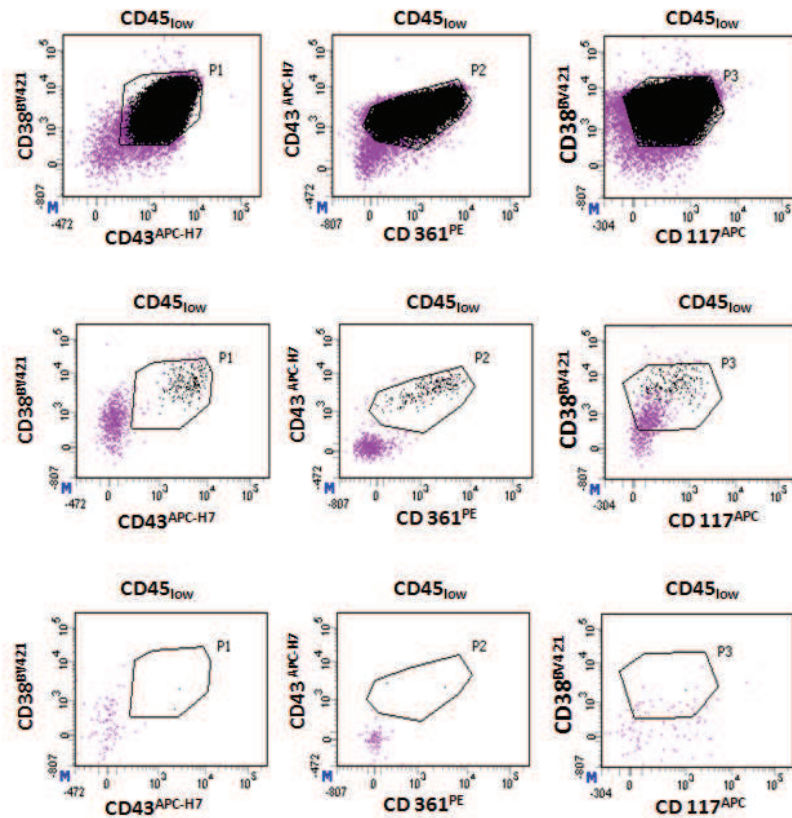


Figure 55. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicolore (CFM) dans des suspensions ovariennes contenant des follicules isolés après ajout de 10^5 cellules leucémiques. Seuls les cellules nucléées vivantes SYTO13⁺/7AAD⁻ qui sont CD45_{low} ont été représentées (points violets); Les points noirs représentent les cellules leucémiques détectées par leur immunophénotype caractéristique : CD38⁺/CD43⁺/CD361⁺/CD117⁺ parmi les CD45_{low}. Un évènement positif doit être à l'intersection des populations P1 (CD38 versus CD43), P2 (CD43 versus CD361) et P3 (CD38 versus CD117); A. Contrôle positif (cellules leucémiques); B. Analyse par CFM d'une suspension ovariennes contenant des follicules isolés après ajout de 10^5 cellules leucémiques (n = 2069 évènements détectés); C. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contaminée par 10^5 cellules leucémiques après trois lavages (n = 7 évènements détectés).

Enfin, lorsque 10^4 cellules leucémiques ont été ajoutées aux suspensions ovariennes, une moyenne de 19 ± 15 évènements a été détectée avant lavages (minimum = 1; maximum = 37; n = 8 suspensions ovariennes analysées), passant à une moyenne de 1 ± 1 évènement détecté après 3 lavages (minimum = 0; maximum = 2; n = 8 suspensions ovariennes analysées) (Figure 56).

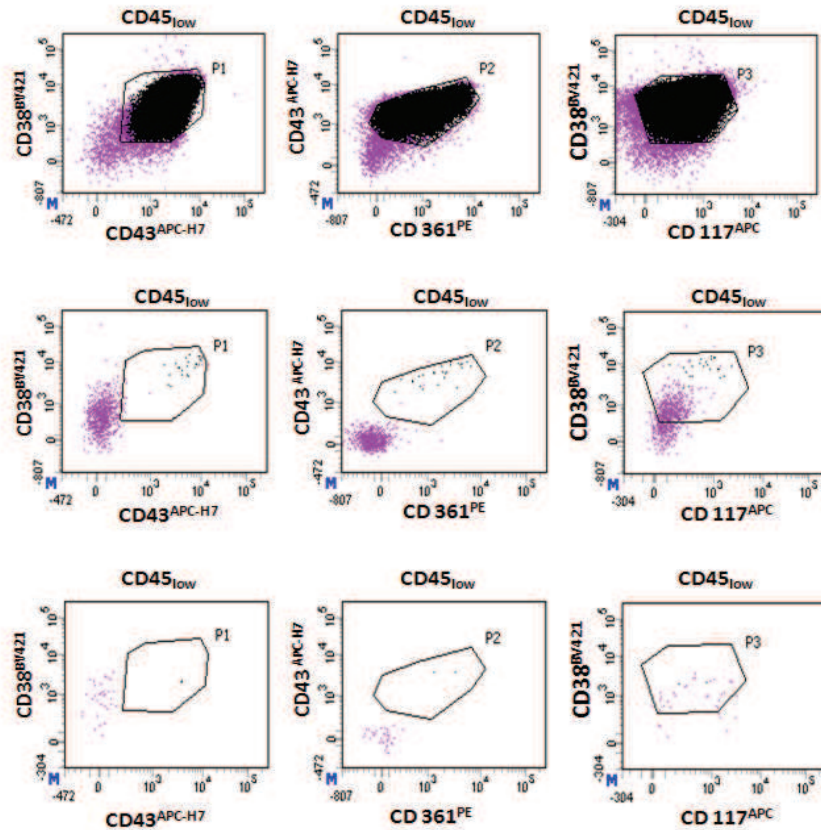


Figure 56. Quantification des cellules leucémiques par cytométrie en flux multicolore (CFM) dans des suspensions ovariennes contenant des follicules isolés après ajout de 10^4 cellules leucémiques. Seuls les cellules nucléées vivantes SYTO13⁺/7AAD⁻ qui sont CD45_{low} ont été représentées (points violets); Les points noirs représentent les cellules leucémiques détectées par leur immunophénotype caractéristique : CD38⁺/CD43⁺/CD361⁺/CD117⁺ parmi les CD45_{low}. Un événement positif doit être à l'intersection des populations P1 (CD38 versus CD43), P2 (CD43 versus CD361) et P3 (CD38 versus CD117); A. Contrôle positif (cellules leucémiques); B. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contenant des follicules isolés après ajout de 10^4 cellules leucémiques (n = 2069 événements détectés); C. Analyse par CFM d'une suspension ovarienne contaminée par 10^4 cellules leucémiques après trois lavages (n = 7 événements détectés).

3.3. Viabilité

Afin d'évaluer l'impact de notre technique d'isolement et de purification effectuée comportant trois lavages successifs, la viabilité de 323 follicules a été analysée après les trois lavages. Le pourcentage de viabilité obtenu a été de 97,2 % après les trois lavages (n = 314/323 follicules analysés) (Tableau 10).

Nombre d'expériences	V1	V2	V3	V4	Pourcentage de viabilité
1	21	10	2	0	93,9 %
2	16	7	3	0	88,5 %
3	20	15	0	0	100 %
4	60	8	3	0	95,8 %
5	52	5	1	0	98,3 %
6	92	8	0	0	100 %
Total	261	53	9	0	97,2 %

Tableau 10. Viabilité des follicules isolés, de V1 à V4, en fonction du nombre de cellules de la granulosa endommagées, après 3 lavages.

DISCUSSION

Codification d'une technique d'isolement de follicules pré-antraux avec une collagénase de grade GMP

Pour les patientes chez lesquelles il y aurait un risque de réintroduire des cellules malignes potentiellement présentes au sein du greffon, l'utilisation de follicules pré-antraux isolés pourrait être une alternative à l'autogreffe de fragments de cortex ovarien cryoconservés. De nombreuses méthodes de dissociation du tissu ovarien ont été testées afin d'isoler des follicules ovariens humains (Abir *et coll.*, 2001; Dolmans *et coll.*, 2006; Lierman *et coll.*, 2015; Telfer and Zelinski, 2013; Vanacker *et coll.*, 2011). L'utilisation de collagénases non purifiées ne peut être envisagée dans une stratégie de thérapie cellulaire, du fait d'un niveau en endotoxines trop élevé et des variations d'activités spécifiques observées entre les différents lots. Seules des enzymes produites selon les bonnes pratiques de fabrication pourront être utilisées pour l'obtention de follicules isolés, en prévision de leur utilisation chez des patientes.

La libérase DH, produite dans des conditions GMP, a déjà montré son efficacité dans l'isolement de follicules ovariens humains. En effet, un protocole d'isolement a été codifié par Vanacker *et coll.* afin d'obtenir un grand nombre de follicules viables et intacts même après un temps de culture *in vitro* (Vanacker *et coll.*, 2011). Elle est de ce fait l'enzyme de référence afin d'isoler des follicules ovariens humains. La libérase DH n'est cependant pas autorisée actuellement pour une utilisation à visée clinique en France. La collagénase NB1 qui possède également le grade GMP fait quant à elle partie des produits thérapeutiques annexes (PTA) autorisés par l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments en vue d'une utilisation à visée thérapeutique humaine (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), 2014). La collagénase NB1 de grade GMP est utilisée pour l'isolement des îlots pancréatiques pour la transplantation chez l'homme (Bucher *et coll.*, 2004). Afin d'isoler d'autres types cellulaires, la collagénase NB6 est l'unique enzyme de type NB qui possède également un grade GMP et qui pourrait donc être envisagée en alternative à la libérase DH. Elle n'est pas encore reconnue comme PTA, contrairement à la collagénase NB1. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée afin d'évaluer la capacité d'une collagénase de type NB à dissocier du tissu ovarien humain. La mise au point et la validation d'un protocole d'isolement de follicules pré-antraux ovariens avec la collagénase NB6 est donc un pré-requis indispensable avant d'envisager l'utilisation de cette enzyme dans une étude clinique.

La première partie de ce travail a été d'évaluer une nouvelle enzyme de grade GMP, la collagénase NB6, pour dissocier des fragments de cortex ovarien humains en vue d'obtenir des follicules pré-antraux isolés. La technique de dissociation du tissu ovarien humain est une méthode qui a été préalablement codifiée au sein de notre laboratoire avec une collagénase de type IA. La collagénase NB6, qui est composée de collagénases de type I et II, a donc été comparée à la collagénase IA et la libérase DH; les mêmes conditions de dissociation (concentration et activité enzymatique, temps d'incubation, action mécanique) ont été respectées afin de comparer les collagénases NB6 et IA. Toutefois, afin de se rapprocher des résultats obtenus par les équipes de recherche utilisant actuellement la libérase DH, le temps d'incubation et la concentration de la libérase DH, précédemment répertoriés dans la littérature (Paulini *et coll.*, 2016; Soares *et coll.*, 2015a; Vanacker *et coll.*, 2011) furent respectés.

Le rendement en follicules isolés obtenus avec la collagénase NB6 a été similaire à celui obtenu avec la libérase DH et la collagénase IA. La dissociation du tissu ovarien a été efficace dans les trois cas, toutefois des fragments résiduels étaient toujours présents dans les solutions enzymatiques après la dissociation de gros fragments. Les temps d'incubation n'ont pas pour autant été prolongés afin d'éviter d'endommager les follicules présents et parce que le nombre de follicules obtenus était suffisant. De plus, la présence de fragments résiduels n'a pas eu d'incidence sur l'étape de purification par prélèvement manuel des follicules réalisée par la suite. Afin de minimiser la présence de résidus éventuels, la dissociation de plus de deux fragments de cortex par volume de solution enzymatique est déconseillée.

Une grande disparité en ce qui concerne le nombre de follicules obtenus après la dissociation de fragments provenant d'une même patiente a également été observée quelle que soit l'enzyme utilisée. La variabilité en densité folliculaire peut être due à l'hétérogénéité de répartition des follicules au sein du cortex ovarien, mais également à l'origine des fragments, la source étant des biopsies de cortex ovariens de patientes souffrant du syndrome des ovaires polykystiques. Même si ces patientes rencontrent des problèmes de fertilité associés à un nombre exagérément élevé de follicules antraux, les follicules présents au sein des ovaires sont toujours viables, et peuvent être utilisés pour nos expériences au même titre que des fragments de cortex ovariens de patientes saines.

Il est impossible à ce jour de fixer le nombre de follicules pré-antraux isolés qui seront nécessaires pour avoir une reprise et un maintien de la folliculogenèse *in vivo*. Pour toutes nos expériences, un à deux fragment(s) ont été décongelé(s) par patiente, ce qui nous a permis d'obtenir en moyenne 80 follicules pour 100 mg de cortex ovarien.

La richesse folliculaire variant considérablement d'un fragment à un autre (Schmidt *et coll.*, 2003), un nombre important de fragments ovariens cryopréservés devront ainsi être dissociés en vue d'une utilisation des follicules isolés. En effet, en prenant en compte les résultats obtenus, il faudrait environ 10 fragments de cortex ovarien décongelés d'un poids d'environ 100 mg chacun pour être sûr d'obtenir un nombre moyen d'environ 1000 follicules ovariens isolés. Les fragments de cortex ovariens utilisés au cours des expériences réalisées provenaient de patientes « saines ». Les fragments cryopréservés de patientes leucémiques ont en général une taille plus importante. En effet, lors de la dernière étude réalisée au sein de notre équipe, le poids moyen des fragments décongelés provenant de patientes leucémiques a été de 180 mg (Zver *et coll.*, 2017). On peut donc supposer qu'il faudrait dissocier moins de fragments cryopréservés de patientes leucémiques afin d'obtenir le même nombre de follicules isolés, en partant du principe que la densité folliculaire n'est pas significativement différente.

La majorité des follicules isolés ont été des follicules de type primordiaux quelle que soit l'enzyme utilisée. Néanmoins, un plus grand nombre de follicules secondaires a été obtenu après dissociation avec la libérase DH. La répartition folliculaire a été similaire après dissociation avec la collagénase IA et la NB6, alors que le pourcentage de follicules secondaires a été plus important et proche de celui des follicules primaires avec la libérase DH. Ces observations ont pu être corrélées aux résultats obtenus par la comparaison des diamètres des follicules isolés. En effet, le diamètre moyen des follicules isolés avec la libérase DH était significativement supérieur à celui obtenu avec la collagénase NB6 et la collagénase IA. Sachant que les suspensions obtenues après dissociation avec la libérase DH n'ont pas été filtrées, afin d'être dans les mêmes conditions que celles décrites dans la littérature, un nombre plus important de follicules de diamètre supérieur ou égal à 60 μm ont donc pu être retrouvés lors de l'isolement. Il faut toutefois noter que des follicules de diamètre supérieur à 60 μm ont certes été retrouvés, mais l'absence de filtration n'a pas eu d'incidence sur le rendement folliculaire obtenu. L'étape de filtration préalable à l'isolement manuel ne réduirait donc pas considérablement le nombre de follicules résultant de la dissociation de fragments de tissu ovarien humain cryopréservé, comme décrit dans la partie 1.1. des résultats.

Afin d'évaluer la viabilité des follicules isolés après une autoconservation de fragments de cortex ovarien, la coloration au bleu Trypan était utilisée dans le laboratoire (Fauque *et coll.*, 2007). Une précédente étude avait montré que la coloration au bleu trypan était une technique très fiable afin de déterminer la survie des follicules ovariens isolés (Sanfilippo *et coll.*, 2011).

Cependant, nous avons observé que l'interprétation de la coloration bleue obtenue après exposition au bleu Trypan pouvait parfois être ambiguë notamment pour les follicules faiblement colorés. En effet, lorsque la solution de coloration au bleu Trypan est ajoutée dans la solution contenant les follicules isolés, un bruit de fond bleu pâle correspondant à la coloration peut être observé au fond de la boîte de pétri ; les follicules endommagés mais peu colorés sont donc dans ce cas difficiles à distinguer avec les follicules non endommagés, qui eux restent incolores. La technique de viabilité dite « live/dead » basée sur la fluorescence a permis une évaluation plus rapide et précise des cellules endommagées ou mortes qui émettent une fluorescence rouge, contrairement aux vivantes qui sont vertes. Cette technique permet également de faire une distinction entre les follicules peu endommagés et fortement endommagés. L'évaluation de la viabilité folliculaire à long terme ne peut toutefois pas être effectuée avec cette technique, la solution pouvant être toxique pour les follicules après une trop longue exposition, tout comme cela peut être observé après une exposition prolongée au bleu Trypan. En comparant les deux techniques de viabilité, aucune différence significative n'a été observée. La technique de viabilité « live/dead » a donc été utilisée par la suite et a été considérée comme la technique de choix afin d'évaluer la survie des follicules isolés, sur un échantillon de cellules, dans le cadre d'un protocole clinique. La majorité des follicules isolés a été qualifiée de vivants ou de très peu endommagés après la dissociation de fragments de cortex ovariens cryopréservés, en effet le taux de survie des follicules isolés a été supérieur à 90 %, quelle que soit l'enzyme. Ces résultats sont en adéquation avec les taux de viabilité obtenus par d'autres équipes, notamment Soares *et coll.*, qui travaillent sur l'isolement de follicules ovariens humains (Lierman *et coll.*, 2015; Soares *et coll.*, 2015a; Soares *et coll.*, 2017; Vanacker *et coll.*, 2011; Vanacker *et coll.*, 2013). Toutefois, un nombre important de débris, correspondant à des cellules mortes et à des résidus conjonctifs, a été observé après utilisation de la collagénase IA. La présence de ces débris peut rendre le processus d'isolement manuel avec une pipette de dénudation plus long et plus difficile. Ces débris peuvent également s'accrocher aux follicules ovariens et créer des amas de cellules mortes, que l'on pourrait confondre avec des follicules endommagés, ce qui pourrait fausser les résultats obtenus. La présence de débris pourrait aussi être dangereuse dans le cas d'une dissociation de fragments de cortex ovarien contaminés car ces débris pourraient créer des amas avec des cellules malignes qui iront se coller aux follicules ovariens.

Conditionnement de follicules ovariens pré-antraux isolés

Une folliculogénèse complète par culture *in vitro* de follicules ovariens humains isolés n'a toujours pas été obtenue dans l'espèce humaine, du fait de sa durée et de la complexité du processus de développement et de régulation folliculaire (Abir *et coll.*, 1999; Barrett *et coll.*, 2010; Smits and Cortvrindt, 2002; Xu *et coll.*, 2009; Yin *et coll.*, 2016b). La folliculogénèse dure environ 6 mois chez la femme (Gougeon, 2011), la reproduire entièrement *in vitro* pourrait induire des modifications génétiques et épigénétiques, dont nous ne sommes pas encore en mesure d'évaluer l'ampleur à long terme (Suzuki and Donnez, 2016). La réutilisation de follicules pré-antraux serait une meilleure option d'un point de vue pratique et éthique. Toutefois, leur utilisation pourrait ne pas permettre une reprise de la folliculogénèse à long terme, le risque que les follicules isolés, une fois transplantés, s'activent tous en une seule vague ne pouvant être exclu. Afin de maintenir la survie et le développement des follicules, un support matriciel est nécessaire (Hornick *et coll.*, 2012). En effet, l'absence de support pour maintenir la structure tridimensionnelle des follicules peut être à l'origine de leur perte (Amorim *et coll.*, 2009). Ce support doit être assez rigide pour maintenir les interactions entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui l'entourent, tout en étant assez souple pour permettre l'expansion des follicules ainsi que la colonisation des cellules environnantes, notamment les cellules théquales, et la diffusion de facteurs de croissance au sein du support qui se dégradera progressivement.

La deuxième partie de ce travail a été d'évaluer une méthode de conditionnement des follicules isolés en vue d'une future application en thérapie humaine. L'utilisation de fragments de cortex ovarien décellularisés pourrait être une solution envisageable car cette technique permet de maintenir la structure et l'architecture de l'ovaire humain. Une étude de Laronda *et coll.* a montré que la viabilité et la fonction endocrine de follicules de souris ensemencés dans un ovaire décellularisé pouvaient être maintenue (Laronda *et coll.*, 2015). Nous avons donc dans un premier temps effectué des expériences consistant à décellulariser des fragments de cortex ovarien humain cryoconservés. La présence de matériel nucléaire a été recherchée à l'aide du DAPI, une molécule fluorescente qui va se lier aux bases de l'ADN et donc permettre de détecter et de quantifier l'ADN en émettant une fluorescence bleue. Le détergent utilisé, ici le SDS, a permis d'éliminer les cellules, les débris, ainsi que le matériel nucléaire présent dans les fragments corticaux préalablement décongelés. Toutefois, une fragilité des fragments décellularisés a pu être observée, avec une déformation de la structure même de la matrice extracellulaire.

Ceci peut être dû à une concentration en détergent trop importante ou encore à des temps d'incubation trop longs compte tenu de la petite taille des fragments utilisés. Il a déjà été décrit que le SDS pouvait endommager la structure même du tissu à décellulariser et qu'il était également cytotoxique, d'où la nécessité d'éliminer l'effet cytotoxique du SDS en utilisant des traitements complémentaires tels que des lavages avant d'envisager une recellularisation (Gilpin and Yang, 2017).

Des techniques consistant à injecter des follicules isolés au sein des fragments ovariens décellularisés ont été testées, toutefois elles n'ont pas été concluantes. En effet, des fuites ont été observées juste après l'injection de solutions contenant les follicules isolés. Il a été suggéré que les matrices de tissu décellularisé doivent être recouvertes d'un gel (de type collagène) juste après l'injection afin de minimiser les fuites pouvant avoir lieu (Miyazaki and Maruyama, 2014). Une autre solution serait de déposer les follicules sur les fragments décellularisés, et de les mettre en culture afin que les follicules puissent s'intégrer progressivement à la surface des fragments décellularisés, comme cela a été effectué par Laronda *et coll.*, avec des cellules ovariennes (Laronda *et coll.*, 2015). Un deuxième fragment décellularisé pourrait éventuellement être ajouté au-dessus du premier fragment sur lequel seront déposés les follicules isolés, afin de constituer une forme de « sandwich » et donc de réduire la fuite des follicules, qui pourrait se produire lors d'un changement du milieu de culture *in vitro*. La méthode d'utilisation de fragments décellularisés de cortex ovarien humain doit encore être adaptée afin d'améliorer les expériences d'ensemencement de follicules ovariens isolés.

L'utilisation de biomatériaux a également été envisagée en tant que support matriciel pour les follicules isolés. Notamment, la fibrine a souvent été utilisée pour la culture *in vitro* de follicules ovariens et a permis la survie ainsi que le développement de follicules ovariens dans des conditions de xénogreffes chez la souris (Chiti *et coll.*, 2017a; Dolmans *et coll.*, 2008; Paulini *et coll.*, 2016). La fibrine étant composée de fibrinogène et de thrombine purifiée d'origine humaine, elle peut être utilisée en clinique chez des patientes.

Nous avons donc, dans un deuxième temps, évalué la capacité de la fibrine à maintenir la viabilité et la structure de follicules pré-antraux préalablement isolés avec la collagénase NB6. Etant donné qu'une fibrine humaine, nommée Evicel®, est actuellement utilisée en clinique en France, nous avons privilégié son utilisation à celle d'autres biomatériaux tels que l'alginate (Amorim *et coll.*, 2009; Camboni *et coll.*, 2013; Kniazeva *et coll.*, 2015; Laronda *et coll.*, 2014; Vanacker and Amorim, 2017; Vanacker *et coll.*, 2014). Les concentrations en fibrinogène et en trombine, les deux constituants des gels de fibrine, peuvent avoir un impact sur la morphologie et la rigidité de la matrice obtenue.

Deux concentrations ont été retenues, F12,5/T1 et F50/T10, basées sur les résultats obtenus après les cultures de follicules isolés effectuées dans des gels de fibrine (Chiti *et coll.*, 2018; Luyckx *et coll.*, 2013; Paulini *et coll.*, 2016). Les performances obtenues en termes de maniabilité et de résistance ont été optimales avec des concentrations plus élevées de 50 mg/ml en fibrinogène et 10 UI/ml en thrombine (F50/T10). A cette concentration, la polymérisation a été rapide mais pas immédiate, ce qui a permis de mélanger les deux composants et d'y intégrer les follicules isolés avec assez de facilité, comme cela avait été décrit par Paulini *et coll.* (Paulini *et coll.*, 2016). Une fois polymérisés, les gels peuvent être manipulés à l'aide d'une pince, ce qui facilitera une éventuelle manipulation au bloc opératoire lors de leur implantation chez la patiente. Les concentrations de F50/T10 ont donc été retenues pour les expériences de culture *in vitro*.

La culture de follicules ovariens isolés est un outil efficace afin d'évaluer les effets secondaires de l'utilisation de la collagénase NB6 sur la survie des follicules isolés. En effet, les follicules peuvent rapidement se détériorer après une culture *in vitro*, alors qu'ils semblaient être vivants et de morphologie normale juste après la dissociation (Lenie *et coll.*, 2004). Dans ce travail, 90,7 % des follicules préalablement isolés avec la collagénase NB6 ont été qualifiés de vivants ou de peu endommagés après trois jours de culture *in vitro* dans des gels de fibrine F50/T10. Ces résultats ont permis de confirmer que la collagénase NB6 n'avait pas eu d'impact sur la viabilité folliculaire.

Le pourcentage de follicules ayant proliféré a été de 45 %, et toujours inférieur à 50 %, même après les trois jours de culture *in vitro*. Les follicules en croissance observés étaient principalement des follicules secondaires, les résultats obtenus indiquent donc que les follicules primaires et secondaires, ont continué leur développement, tandis que les follicules primordiaux ont maintenu leur état de quiescence, ce qui est un signe de bonne santé folliculaire comme cela a été décrit par Scalercio *et coll.* (252). Ces résultats ont pu être corroborés par les variations de diamètre observés après trois jours de culture *in vitro*. En effet, une croissance moyenne d'environ 10 μm a été observée, ce qui est cohérent avec les données répertoriées dans la littérature après 7 jours de culture *in vitro* (Amorim *et coll.*, 2009; Vanacker *et coll.*, 2013).

Une distribution hétérogène des follicules a toutefois commencé à se dessiner à partir de trois jours, avec deux populations de diamètre différent. Ce qui laisse supposer que la population de follicules de petite taille, inférieure à 42 μm de diamètre, pourrait correspondre aux follicules qui sont toujours quiescents; tandis que les follicules de diamètre supérieur correspondraient aux follicules qui étaient déjà activés et donc en cours de croissance.

Une période de culture de 7 jours permettrait de renforcer cette hypothèse mais également de montrer que les matrices de fibrine n'activent pas tous les follicules primordiaux, en vue d'une implantation *in vivo*. En effet, le but de la culture *in vitro* n'a pas été d'induire une folliculogénèse mais de maintenir un maximum de follicules dans leur état de quiescence pour qu'ils subissent un processus d'activation similaire aux follicules présents au niveau de l'ovaire normal, après leur réintroduction si possible au sein de l'ovaire restant de la patiente. Néanmoins, la culture *in vitro* de trois jours dans un gel de fibrine a été suffisante pour évaluer l'effet de la dissociation avec la collagénase NB6 et de l'isolement manuel sur les follicules ovariens humains.

L'équipe de Xu *et coll.*, avait émis l'idée que les follicules suivraient différents modèles de croissances (Xu *et coll.*, 2010). En effet, après avoir cultivé des follicules de macaques dans des gels d'alginate, ils ont remarqué que trois groupes hétérogènes de follicules se dessinaient; des follicules quiescents, des follicules à croissance lente et des follicules à croissance rapide. Ils ont aussi suggéré que ces trois comportements n'étaient pas toujours observés après une culture *in vitro*, notamment du fait du nombre plus petits d'échantillons étudiés, de la durée de la culture qui peut être plus courte et du stade de départ des follicules avant la culture. Les résultats que nous avons obtenus vont dans le sens de cette étude, et indiqueraient que tous les follicules ne seraient pas activés par la culture 3D dans des gels de fibrine. En partant de ce principe, on peut s'attendre à ce que les follicules isolés avec la collagénase NB6 pourraient être transplantés chez les patientes et qu'une fois confrontés aux conditions physiologiques *in vivo*, ils se répartiraient en deux groupes de follicules : un groupe de follicules non activés qui constituerait une « réserve ovarienne » temporaire de follicules primordiaux qui pourraient s'activer de manière différée en plusieurs vagues, et un groupe de follicules qui poursuivraient leur développement. Un nombre conséquent de follicules rentreront également en apoptose, il faudra donc envisager le risque de devoir greffer un maximum de follicules isolés en une seule fois, ou alors en cas d'échec de devoir recommencer avant d'observer une reprise de la fonction ovarienne. Les lieux de greffe privilégiés dans le cas d'une greffe de follicules ovariens isolés seront soit l'ovaire restant si celui-ci est toujours présent et non atrophié, soit la cavité péritonéale. Un nombre plus important de gels contenant des follicules isolés pourrait être transplanté si la greffe est effectuée au niveau de la cavité péritonéale, l'incision réalisée à ce niveau afin de créer une poche pouvant être élargie en fonction des besoins.

Une dégradation progressive des gels de fibrine et une perte en follicules ont été observées lors d'une culture plus longue. Afin d'inhiber ce processus de dégradation des gels de fibrine, des composants tels que l'aprotinine, pourraient être ajoutés au milieu de culture (Shikanov *et coll.*, 2009). En effet, l'aprotinine est une protéine soluble d'origine bovine qui inhibe l'action de la kallikréine, une sérine protéase qui induit la transformation de plasminogène en plasmine. La plasmine étant responsable du clivage des ponts peptidiques constituant la fibrine, l'inhibition de cette réaction va empêcher la dégradation des gels de fibrine (Hoffmann *et coll.*, 1987).

Toutefois, d'autres études réalisées sur la fibrine rapportent également cette dégradation qui favoriserait le développement et la croissance progressive des follicules dans l'organisme après la greffe. En effet, il a déjà été décrit dans la littérature que les gels de fibrine avaient tendance à se dégrader en présence de follicules dans des conditions de culture *in vitro*, car les follicules ovariens produisent des activateurs de plasminogène et des facteurs de croissance qui vont induire une fibrinolyse (Chiti *et coll.*, 2017a; Shikanov *et coll.*, 2011; Thorne *et coll.*, 2015). Seuls les follicules endommagés ne seront pas en mesure de produire ces facteurs, la dégradation de la fibrine est donc un gage de la qualité folliculaire (Chiti *et coll.*, 2017a).

Afin de favoriser la survie et le développement des follicules ovariens, des cellules stromales pourraient être ajoutées dans les gels de fibrine, car il a été démontré que ces cellules sécrètent des facteurs qui favorisent positivement la transition des follicules primordiaux à primaires (Skinner, 2005). Il a été envisagé que des cellules stromales provenant du tissu ovarien de la patiente en rémission pourraient être récupérées, ces cellules étant dépourvues de cellules malignes. La co-culture de cellules stromales avec les follicules permettrait leur croissance, et elles pourraient participer à la constitution plus rapide d'une couche de cellules théquales qui composent les follicules antraux, en parallèle de l'action des cellules stromales externes qui vont coloniser la matrice de fibrine au cours du temps (Soares *et coll.*, 2015b). La récupération de cellules stromales à partir du tissu ovarien de la patiente nécessiterait une intervention chirurgicale supplémentaire qu'il faut prendre en compte dans la prise de décision de la meilleure option à proposer. Toutefois, afin d'éviter cette procédure, l'utilisation de cellules stromales provenant d'autres tissus de la patiente, tel que le derme, pourrait être envisageable.

Des cellules endothéliales, récupérées par tri cellulaire, pourraient également être ajoutées afin de favoriser la revascularisation au sein du support matriciel (Dath *et coll.*, 2011).

En effet, il a récemment été démontré que la co-transplantation de cellules endothéliales avec des fragments de tissu ovarien humains permettait de favoriser la production de vaisseaux et la survie des follicules ovariens tout en réduisant la présence de zone fibrotique après xéno-greffes chez la souris. Il est toutefois possible que lorsque que les matrices ne contenant que des follicules isolés seront transplantées chez la patiente, les cellules environnantes puissent coloniser la matrice biodégradable, ne rendant pas nécessaire l'utilisation d'autres cellules en co-culture préalable (Man *et coll.*, 2017).

L'ovaire est un organe hétérogène et compartimenté, la partie corticale de l'ovaire étant plus dense et plus rigide que la partie médullaire richement vascularisée; cette architecture complexe peut être recréée à l'aide d'une imprimante 3D, qui permet de contrôler la taille et la forme de la trame conjonctive qui va composer l'ovaire artificiel. Selon Laronda *et coll.*, l'ovaire artificiel doit être assez poreux pour favoriser l'infiltration rapide du réseau vasculaire *in vivo*, ce qui préviendrait le risque d'ischémie post-greffe observée lors de l'autotransplantation de fragments de cortex ovarien. Aussi, la présence de pores de taille optimale devrait favoriser la survie des follicules en augmentant leur surface de contact avec la matrice (Laronda *et coll.*, 2017). Pour pouvoir durer dans le temps, l'ovaire artificiel doit en effet pourvoir mimer au mieux les fonctions d'un ovaire humain, pour au final le supplanter, afin que les follicules puissent s'y développer complètement. L'équipe de Laronda *et coll.* a réussi à reconstituer une matrice 3D composée de micropores distribués de manière homogène, orientée à 60 degrés, formée à base de gélatine de porc partiellement réticulée et dérivée du collagène provenant de la peau et des os. Une fois réimplantée chez la souris, cette matrice dans laquelle ont été ensemencés des follicules ovariens pré-antraux a permis une reprise de la fonction ovarienne et la naissance de souriceaux viables (Laronda *et coll.*, 2017). Aucun facteur de croissance angiogénique ni aucune stimulation hormonale n'a été nécessaire, ce qui montre que l'utilisation de follicules isolés dans un environnement propice a permis de produire les facteurs nécessaires à leur développement.

Purification de suspensions folliculaires dans le cas de leucémies aiguës

Les leucémies sont des pathologies à haut risque de réintroduction de cellules cancéreuses par autogreffe de fragments de cortex ovarien, étant donné que les cellules leucémiques peuvent être à la fois retrouvées dans le sang et dans les organes, tels que les ovaires. A l'heure actuelle, pour les patientes atteintes de leucémie, la réutilisation des fragments de cortex ovarien cryoconservés est souvent déconseillée, la balance bénéfice-risque étant « généralement » défavorable à l'autogreffe. En effet, l'autogreffe de fragments de cortex ovarien ne peut être réalisée que dans le cas où l'analyse de la maladie résiduelle est négative, et si le bilan pré-greffe, qui dépend du type de traitement administré et de la phase de la maladie au moment de la cryopréservation de tissu ovarien, ne contre-indique pas cette intervention. L'évaluation du statut carcinologique de la patiente au moment de la cryopréservation des fragments de cortex ovarien, à l'aide des techniques de détection actuelles telles que la RT-qPCR et la cytométrie en flux multicolore, est fondamentale (Amiot *et coll.*, 2013; Zver *et coll.*, 2014; Zver *et coll.*, 2015). Il est donc primordial de s'assurer que les suspensions contenant les follicules isolés sont dépourvues de cellules malignes avant de pouvoir envisager une réutilisation des follicules isolés en clinique en tant qu'alternative à l'autogreffe de tissu ovarien cryopréservé. La possibilité de purifier des suspensions folliculaires par tri cellulaire à l'aide de billes magnétiques afin d'éliminer des cellules malignes a déjà été envisagée (Schroder *et coll.*, 2004). Toutefois, cette technique peut être longue et son utilisation en clinique nécessiterait l'utilisation d'un matériel stérile ou à usage unique, ce qui peut être difficilement accessible et très onéreux. L'équipe de Soares *et coll.* a démontré que leur technique d'isolement suivie de trois lavages successifs permettait d'éliminer des cellules leucémiques présentes dans des suspensions folliculaires artificiellement contaminées (Soares *et coll.*, 2015a), mais également dans des suspensions provenant de patientes leucémiques (LAM, LAL et LMC) et dont la moitié avait reçu un traitement par chimiothérapie au moment de la cryoconservation de leur tissu ovarien (Soares *et coll.*, 2017).

La troisième partie de ce travail de thèse a donc été d'évaluer la sécurité carcinologique des suspensions folliculaires obtenues après la dissociation des fragments de cortex ovariens cryoconservés avec la collagénase NB6. Des cellules leucémiques de patients atteints de LAM et de LAL ont été ajoutées aux suspensions folliculaires obtenues après dissociation tissulaire avec la collagénase NB6. Trois lavages successifs ont ensuite été effectués afin de purifier les suspensions pour ne garder que des follicules isolés.

Contrairement à l'équipe de Soares *et coll.*, qui a utilisé la RT-qPCR afin d'évaluer la présence de cellules malignes contenues dans les suspensions folliculaires avant et après lavages, nous avons utilisé la cytométrie en flux qui permet de détecter et de quantifier le nombre de cellules leucémiques vivantes présentes. Il est possible d'estimer le nombre absolu de cellules leucémiques potentiellement présentes dans les fragments corticaux en se basant sur le volume des fragments ovariens cryopréservés et le volume moyen du sang dans les vaisseaux de la patiente (Soares *et coll.*, 2015a). En effet, le territoire vasculaire des fragments de tissu ovarien est toujours présent étant donné que les cellules sanguines ne sont pas éliminées par perfusion des vaisseaux avant congélation, contrairement à ce qui pourrait être réalisé lors de la congélation d'un organe entier. Toutefois, il reste impossible de prévoir avec précision le nombre de cellules leucémiques présentes dans les fragments cryoconservés de patientes leucémiques par RT-qPCR. La cytométrie en flux est une technique d'analyse dont l'efficacité et la sensibilité sont comparables à la RT-qPCR afin de détecter la maladie résiduelle dans des fragments cryoconservés de patientes ayant souffert de leucémie (Amiot *et coll.*, 2013; Zver *et coll.*, 2014; Zver *et coll.*, 2015; Zver *et coll.*, 2017). La CFM a permis avec précision de détecter le nombre de cellules leucémiques présentes dans des suspensions folliculaires sur le nombre total de cellules vivantes analysées, même lorsque le nombre de follicules isolés était très faible. Lorsque les marqueurs moléculaires nécessaires à la technique de RT-qPCR ne sont pas disponibles, la cytométrie en flux est la seule technique de détection disponible et peut potentiellement être applicable à toutes les patientes atteintes de leucémie afin d'évaluer leur risque de maladie résiduelle.

L'ajout d'un excès de cellules leucémiques, allant de 10^3 à 10^6 cellules nous a permis d'avoir une sensibilité de la CFM de l'ordre de 10^{-5} au cours des expériences réalisées, plus important que le seuil de détection clinique de la maladie résiduelle dans le sang par CFM qui est de 10^{-4} (Campana and Coustan-Smith, 1999).

La limite de la technique manuelle d'isolement et de lavages des follicules isolés repose sur le fait que les cellules leucémiques peuvent être confondues avec des cellules ovariennes dont la taille est comparable sous observation au microscope, comme cela avait déjà été mentionné par Soares *et coll.* (Soares *et coll.*, 2015a). De plus, le diamètre de la pipette de dénudation utilisée pour prélever les follicules ovariens isolés dans la suspension filtrée après dissociation étant adapté à la taille des follicules, il est facile d'aspirer des cellules leucémiques ou des débris lors de la procédure. La durée de la technique d'isolement peut donc varier en fonction du nombre de follicules à isoler et du nombre de cellules environnantes présentes dans la suspension.

Il a été suggéré par Soares *et coll.* que la durée totale de la technique, comprenant l'isolement et les trois lavages des follicules isolés, n'excède pas 90 minutes afin de ne pas altérer les follicules ainsi obtenus (Soares *et coll.*, 2017).

Le nombre de cellules leucémiques nécessaire pour induire une reprise de la maladie après transplantation de fragments de tissu ovarien n'a pas encore été établi. De même, nous ne pouvons pas évaluer le nombre de cellules malignes qui pourrait induire une rechute après injection ou réutilisation de follicules isolés. En effet, la probabilité d'observer une rechute chez les patientes dépendra de la taille des fragments initialement dissociés, du volume des suspensions folliculaires obtenues (plus le volume sera important, plus il y aura de risque de retrouver des cellules leucémiques résiduelles), ainsi que du niveau de maladie résiduelle préalablement évalué. Il faut toutefois noter que cette évaluation, effectuée sur un prélèvement de sang ou de moelle, ne sera pas représentative des fragments de tissu ovarien qui seront autogreffés, ceux-ci ne pouvant pas être testés avant que la procédure ne soit effectuée. Aussi, l'existence de cellules souches leucémiques chez les patientes en rémission, même plusieurs années après la maladie, ne peut être écartée comme cause possible de rechute (Ford *et coll.*, 2015).

Il est donc primordial d'éliminer au maximum le nombre de cellules leucémiques pouvant contaminer les suspensions folliculaires obtenues après dissociation tissulaire. En nous basant sur les données de l'hématologie, le nombre d'évènement détectés par CFM ne doit pas dépasser le seuil de 20 cellules vivantes détectées (Campana and Coustan-Smith, 1999). Au cours des expériences réalisées, seule une suspension folliculaire a contenu plus de 20 cellules leucémiques après la technique d'isolement et les trois lavages effectués. La majorité des suspensions folliculaires obtenues après trois lavages ne contiendrait donc potentiellement pas un nombre de cellules leucémiques suffisant pour induire une reprise de la maladie si les follicules isolés et purifiés obtenus étaient réintroduits chez une patiente. Le seul cas où plus de 20 cellules leucémiques ont été détectées correspondait à une suspension dans laquelle 1 million de cellules leucémiques avait préalablement été ajoutés. Le nombre de cellules malignes présentes dans les fragments de cortex ovariens cryopréservés de patientes atteintes de leucémie serait probablement plus faible, au vue de la proportion importante de patientes ayant déjà reçu une première ligne de chimiothérapie avant que l'autoconservation ait eu lieu (Abir *et coll.*, 2016; Dolmans *et coll.*, 2010). La viabilité des follicules isolés n'a pas été altérée par la procédure d'isolement et de purification des cellules leucémiques, le taux de survie des follicules isolés étant resté supérieur à 90 %.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse est le point de départ du développement d'un programme de reconstruction ovarienne au sein de notre équipe de recherche.

L'utilisation de follicules ovariens isolés en tant qu'alternative à l'autogreffe de tissu ovarien cryopréservé semble être la solution optimale pour les patientes à risque de localisation métastatique ovarienne qui ne peuvent donc pas bénéficier de la technique d'autogreffe de fragments de tissu ovarien cryoconservés.

Plusieurs techniques de reconstruction ovarienne sont actuellement disponibles et envisageables :

- L'utilisation d'une imprimante 3D (Laronda *et coll.*, 2017) ou la création de moules personnalisables dont la conception est assistée par un ordinateur (Krotz *et coll.*, 2010), actuellement utilisés en ingénierie tissulaire, pourraient permettre de créer une matrice dont la morphologie et la composition serait similaire à l'ovaire humain et qui favoriserait les interactions entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte. Ces techniques permettraient de modifier des paramètres tels que la forme, la taille et l'épaisseur de la matrice obtenue et donc d'avoir un ovaire sur mesure. Cet ovaire artificiel, qui contiendrait notamment des follicules ovariens isolés qui auront préalablement été ensemencés ou intégrés après culture *in vitro*, pourra soit se dégrader avec le temps soit être conservé, en fonction de la composition de la matrice utilisée (agarose, gélatine, etc.). L'utilisation d'un ovaire 3D pourrait également permettre d'effectuer des études expérimentales *in vitro* telles que des tests de différentes drogues au cours d'études pré-cliniques, notamment pour des tests toxicologiques (Shea *et coll.*, 2014), comme c'est actuellement le cas avec les peaux artificielles qui permettent de s'affranchir de l'expérimentation animale.
- Le développement de matrices à base de polymères non dégradables, qui seraient donc greffées de manière permanente chez la patiente a été envisagé par plusieurs équipes de recherche. Récemment, des matrices non dégradables ou mixtes (dégradables en surface uniquement) à base de polyéthylène glycol ont été développées par l'équipe de Shikanov. Il a permis de démontrer dans un modèle murin que la fonction endocrine de souris pouvait être restaurée après la greffe de capsule de polyéthylène glycol contenant des fragments de cortex ovarien (Day *et coll.*, 2018). L'encapsulation des fragments de cortex ovarien, ou de follicules isolés, dans des matrices mixtes et donc permanentes à la surface permettrait d'éliminer le risque de réintroduire des cellules malignes dans l'organisme de la patiente après la greffe, tout en assurant la diffusion des éléments nécessaires à la reprise d'une fonction endocrine.

Cette technique permettrait également de contrôler le risque de perte folliculaire que l'on peut observer avec des matrices biodégradables, du fait de leur dégradation avec le temps à une vitesse qui n'est pas totalement maîtrisée (Chiti *et coll.*, 2018). L'équipe de Shikanov a toutefois observé que les follicules ensemencés dans des matrices non dégradables n'arrivaient pas au stade antral, contrairement à ceux qui étaient dans des matrices mixtes ou biodégradables (Day *et coll.*, 2018). Les matrices non dégradables doivent en effet avoir des propriétés viscoélastiques qui permettront l'expansion des follicules ovariens, dont la taille augmente drastiquement pouvant aller du micromètre à plus de deux centimètres au stades pré-ovulatoire (Gougeon, 1986). L'utilisation de matrices, mixtes ou non, dont le diamètre extérieur sera assez important pour permettre une croissance folliculaire optimale devra donc être développée dans le futur.

- De nombreux progrès sur la culture de follicules isolés au sein de matrices biodégradables d'origine naturelle, et leur transplantation *in vivo* ont récemment été effectués. Au vu des résultats obtenus au cours de nos expériences, les matrices à base de fibrine seraient appropriées au conditionnement des follicules ovariens humains isolés. Toutefois, afin de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques de l'ovaire humain, plusieurs paramètres devront être testés. En effet, plusieurs concentrations en fibrinogène et thrombine devront être évaluées afin de trouver la matrice dont la porosité, l'épaisseur et la rigidité se rapprocheront au mieux d'un ovaire humain. L'équipe de Chiti *et coll.* a récemment montré qu'il y avait toujours une perte importante en follicules après leur ensemencement au sein des matrices de fibrine quelles que soient les concentrations évaluées (Chiti *et coll.*, 2018). Cela a permis de mettre en évidence le fait que la recherche sur les matrices de fibrine n'en est qu'à son point de départ. Les prochaines étapes de recherche sur les follicules ovariens isolés porteront principalement sur la mise en place de conditions optimales afin de réduire la perte folliculaire observée après greffe. En ce qui concerne le développement de techniques de transplantation, il sera donc peut-être nécessaire d'envisager d'effectuer des expériences de xénogreffes ou d'allogreffes chez le gros animal afin de tester l'efficacité des matrices de fibrine que nous avons élaboré, ainsi que d'évaluer le comportement des follicules isolés avec la collagénase NB6 et incorporés dans une matrice de fibrine, dans ces conditions *in vivo*.

Dans le but d'effectuer un suivi de la croissance folliculaire au sein des matrices de fibrine, l'analyse des follicules ovariens après isolement et culture *in vitro* pourrait également être complétée par l'étude de l'expression de marqueurs spécifiques,

par analyse immunohistochimique, tel que le facteur de croissance GDF-9 ou la protéine BMP-15 qui sont exprimés par les follicules primaires et agissent en synergie afin de favoriser l'activation des follicules primordiaux (Hreinsson *et coll.*, 2002; Skinner, 2005).

Afin de valider la sécurité carcinologique de l'utilisation des follicules isolés, la dissociation de fragments de tissu ovarien cryopréservés de patientes leucémiques, dont l'ovaire était contaminé lors de la cryoconservation, sera une étape clé dans l'élaboration d'un protocole de reconstruction ovarienne sans risque de réintroduction de cellules malignes. En effet, d'une part les fragments de tissu ovarien cryopréservés de ces patientes leucémiques devront être testés afin d'évaluer si l'administration d'un traitement gonadotoxique préalable à la congélation aurait un impact sur la technique de dissociation enzymatique ainsi que sur le rendement folliculaire obtenu après utilisation de la collagénase NB6. Et d'autre part car la technique de purification de suspension folliculaire doit être validée avec des fragments de cortex ovarien contaminés, qualifiés de positifs pour la maladie résiduelle après analyse par cytométrie en flux. Toutefois, les fragments de patientes leucémiques actuellement conservés au sein des cryobanques de tissus sont principalement réservés pour leur future réutilisation et le nombre de fragments test dédiés à la recherche reste faible.

En conclusion, nous avons réussi à codifier un nouveau protocole d'isolement de follicules ovariens pré-antraux qui nous a permis d'obtenir un nombre élevé de follicules viables et non activés à partir de la dissociation de fragments de cortex ovarien humains, en utilisant la collagénase NB6 produite conformément aux bonnes pratiques de fabrication. Dans 23 cas sur 24, trois lavages des suspensions contenant des follicules isolés ont été suffisants pour assurer la sécurité carcinologique des suspensions folliculaires finales. La collagénase NB6 de grade clinique GMP, combinée avec notre technique d'isolement actuelle, permettra l'utilisation des follicules pré-antraux humains isolés pour de futures applications cliniques chez les patientes, telles que la reconstruction ovarienne, l'injection de suspensions contenant des follicules isolés ou la folliculogénèse *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abir R, Ben-Aharon I, Garor R, Yaniv I, Ash S, Stemmer SM, et coll. Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy. *Human reproduction* (Oxford, England). 2016;31(4):750-62.
2. Abir R, Fisch B, Nitke S, Okon E, Raz A, Ben Rafael Z. Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertility and sterility*. 2001;75(1):141-6.
3. Abir R, Fisch B, Raz A, Nitke S, Ben-Rafael Z. Preservation of fertility in women undergoing chemotherapy: current approach and future prospects. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 1998;15(8):469-77.
4. Abir R, Franks S, Mobberley MA, Moore PA, Margara RA, Winston RM. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. *Fertility and sterility*. 1997;68(4):682-8.
5. Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R, et coll. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Human reproduction* (Oxford, England). 1999;14(5):1299-301.
6. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine reviews*. 2009;30(5):438-64.
7. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Liste des PTA autorisés en France dont l'AMM est active 2014 [cited 2014]. Available from: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/32df630e79a773fccd0aa76833064444.pdf.
8. Ali Mohamed MS. A new strategy and system for the ex vivo ovary perfusion and cryopreservation: An innovation. *International journal of reproductive biomedicine* (Yazd, Iran). 2017;15(6):323-30.
9. Amiot C, Angelot-Delettre F, Zver T, Alvergnas-Vieille M, Saas P, Garnache-Ottou F, et coll. Minimal residual disease detection of leukemic cells in ovarian cortex by eight-color flow cytometry. *Human reproduction* (Oxford, England). 2013;28(8):2157-67.
10. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(2):160-86.
11. Amorim CA, Van Langendonck A, David A, Dolmans MM, Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Human reproduction* (Oxford, England). 2009;24(1):92-9.
12. Anckaert E, De Rycke M, Smits J. Culture of oocytes and risk of imprinting defects. *Human reproduction update*. 2013;19(1):52-66.
13. Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, et coll. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human reproduction* (Oxford, England). 2008;23(10):2266-72.

14. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WH. Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015;3(7):556-67.
15. Angarita AM, Johnson CA, Fader AN, Christianson MS. Fertility Preservation: A Key Survivorship Issue for Young Women with Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2016;6:102.
16. Ataya K, Rao LV, Lawrence E, Kimmel R. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biology of Reproduction*. 1995;52(2):365-72.
17. Azem F, Samara N, Cohen T, Ben-Yosef D, Almog B, Lessing JB, et coll. Assessment of ovarian reserve following ovarian tissue banking and/or GnRH-a co-treatment prior to chemotherapy in patients with Hodgkin's disease. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2008;25(11-12):535-8.
18. Badawy A, Elnashar A, El-Ashry M, Shahat M. Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: prospective randomized study. *Fertility and Sterility*. 2009;91(3):694-7.
19. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2011;13:27-53.
20. Baker TG. Radiosensitivity of mammalian oocytes with particular reference to the human female. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1971;110(5):746-61.
21. Bar-Hava I, Krissi H, Ashkenazi J, Orvieto R, Shelef M, Ben-Rafael Z. Fibrin glue improves pregnancy rates in women of advanced reproductive age and in patients in whom in vitro fertilization attempts repeatedly fail. *Fertility and Sterility*. 1999;71(5):821-4.
22. Barrett SL, Shea LD, Woodruff TK. Noninvasive index of cryorecovery and growth potential for human follicles in vitro. *Biology of Reproduction*. 2010;82(6):1180-9.
23. Bastings L, Beerendonk CC, Westphal JR, Massuger LF, Kaal SE, van Leeuwen FE, et coll. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 2013;19(5):483-506.
24. Bath LE, Anderson RA, Critchley HO, Kelnar CJ, Wallace WH. Hypothalamic-pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 2001;16(9):1838-44.
25. Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 2006;21(12):3258-69.
26. Behringer K, Thielen I, Mueller H, Goergen H, Eibl AD, Rosenbrock J, et coll. Fertility and gonadal function in female survivors after treatment of early unfavorable Hodgkin lymphoma (HL) within the German Hodgkin Study Group HD14 trial. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(7):1818-25.
27. Behringer K, Wildt L, Mueller H, Mattle V, Ganitis P, van den Hoonaard B, et coll. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH-analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP for advanced-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2010;21(10):2052-60.
28. Benard J, Calvo J, Comtet M, Benoit A, Sifer C, Grynberg M. [Fertility preservation in women of the childbearing age: Indications and strategies]. *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction*. 2016;45(5):424-44.
29. Berwanger AL, Finet A, El Hachem H, le Parco S, Hesters L, Grynberg M. New trends in female fertility preservation: in vitro maturation of oocytes. *Future Oncology (London, England)*. 2012;8(12):1567-73.

30. Bildik G, Akin N, Senbabaoglu F, Sahin GN, Karahuseyinoglu S, Ince U, et coll. GnRH agonist leuprolide acetate does not confer any protection against ovarian damage induced by chemotherapy and radiation in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015;30(12):2912-25.
31. Bisharah M, Tulandi T. Laparoscopic preservation of ovarian function: an underused procedure. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;188(2):367-70.
32. Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. *The oncologist*. 2007;12(9):1044-54.
33. Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A, Epelbaum R, Rowe JM, Dann EJ. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. *Fertility and sterility*. 2008;89(1):166-73.
34. Blumenfeld Z, Evron A. Preserving fertility when choosing chemotherapy regimens - the role of gonadotropin-releasing hormone agonists. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2015;16(7):1009-20.
35. Blumenfeld Z, Mischari O, Schultz N, Boulman N, Balbir-Gurman A. Gonadotropin releasing hormone agonists may minimize cyclophosphamide associated gonadotoxicity in SLE and autoimmune diseases. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2011;41(3):346-52.
36. Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental cell research*. 1961;24:495-507.
37. Brandhorst H, Friberg A, Nilsson B, Andersson HH, Felldin M, Foss A, et coll. Large-scale comparison of Liberase HI and collagenase NB1 utilized for human islet isolation. *Cell transplantation*. 2010;19(1):3-8.
38. Bucher P, Mathe Z, Bosco D, Andres A, Kurfuerst M, Ramsch-Gunther N, et coll. Serva collagenase NB1: a new enzyme preparation for human islet isolation. *Transplantation proceedings*. 2004;36(4):1143-4.
39. Burmeister L, Kovacs GT, Osianlis T. First Australian pregnancy after ovarian tissue cryopreservation and subsequent autotransplantation. *The Medical journal of Australia*. 2013;198(3):158-9.
40. Callejo J, Salvador C, Gonzalez-Nunez S, Almeida L, Rodriguez L, Marques L, et coll. Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. *Journal of ovarian research*. 2013;6(1):33.
41. Camboni A, Van Langendonck A, Donnez J, Vanacker J, Dolmans MM, Amorim CA. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology*. 2013;67(1):64-9.
42. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999;38(4):139-52.
43. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5573):1655-7.
44. Cardozo ER, Thomson AP, Karmon AE, Dickinson KA, Wright DL, Sabatini ME. Ovarian stimulation and in-vitro fertilization outcomes of cancer patients undergoing fertility preservation compared to age matched controls: a 17-year experience. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(4):587-96.
45. Castelo-Branco C, Nomdedeu B, Camus A, Mercadal S, Martinez de Osaba MJ, Balasch J. Use of gonadotropin-releasing hormone agonists in patients with Hodgkin's disease for preservation of ovarian function and reduction of gonadotoxicity related to chemotherapy. *Fertility and sterility*. 2007;87(3):702-5.

46. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. 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. *Fertility and sterility*. 1991;55(1):109-13.
47. Chang EM, Song HS, Lee DR, Lee WS, Yoon TK. In vitro maturation of human oocytes: Its role in infertility treatment and new possibilities. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2014;41(2):41-6.
48. Chaput L, Gremeau AS, Vorilhon S, Pons H, Chabrot C, Greze V, et coll. [Fertility preservation in oncology]. *Bulletin du cancer*. 2018;105(1):99-110.
49. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet (London, England)*. 1986;1(8486):884-6.
50. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2000;15(1):165-70.
51. Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, et coll. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 2008;16(5):608-10.
52. Chian RC, Uzelac PS, Nargund G. In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation. *Fertility and sterility*. 2013;99(5):1173-81.
53. Chiti MC, Dolmans MM, Donnez J, Amorim CA. Fibrin in Reproductive Tissue Engineering: A Review on Its Application as a Biomaterial for Fertility Preservation. *Annals of biomedical engineering*. 2017a;45(7):1650-63.
54. Chiti MC, Dolmans MM, Hobeika M, Cernogoraz A, Donnez J, Amorim CA. A modified and tailored human follicle isolation procedure improves follicle recovery and survival. *Journal of ovarian research*. 2017b;10(1):71.
55. Chiti MC, Dolmans MM, Mortiaux L, Zhuge F, Ouni E, Shahri PAK, et coll. A novel fibrin-based artificial ovary prototype resembling human ovarian tissue in terms of architecture and rigidity. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018;35(1):41-8.
56. Chiti MC, Dolmans MM, Orellana R, Soares M, Paulini F, Donnez J, et coll. Influence of follicle stage on artificial ovary outcome using fibrin as a matrix. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2016;31(2):427-35.
57. Chung C, Ma H. Driving Toward Precision Medicine for Acute Leukemias: Are We There Yet? *Pharmacotherapy*. 2017;37(9):1052-72.
58. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohi J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertility and sterility*. 2016;105(3):755-64 e8.
59. Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohi J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertility and sterility*. 2015;104(6):1426-34 e1-8.
60. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2010;25(9):2239-46.
61. Codacci-Pisanelli G, Del Pup L, Del Grande M, Peccatori FA. Mechanisms of chemotherapy-induced ovarian damage in breast cancer patients. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;113:90-6.
62. Cortvrindt RG, Smitz JE. Fluorescent probes allow rapid and precise recording of follicle density and staging in human ovarian cortical biopsy samples. *Fertility and sterility*. 2001;75(3):588-93.
63. Cossigny DA, Findlay JK, Drummond AE. The effects of FSH and activin A on follicle development in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2012;143(2):221-9.

64. Courbiere B, Decanter C, Bringer-Deutsch S, Rives N, Mirallie S, Pech JC, et coll. Emergency IVF for embryo freezing to preserve female fertility: a French multicentre cohort study. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2013;28(9):2381-8.
65. Critchley HO, Wallace WH. Impact of cancer treatment on uterine function. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2005;10.1093/jncimonographs/lgi022(34):64-8.
66. Dath C, Dethy A, Van Langendonck A, Van Eyck AS, Amorim CA, Luyckx V, et coll. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011;26(6):1431-9.
67. Day JR, David A, Cichon AL, Kulkarni T, Cascalho M, Shikanov A. Immunoisolating poly(ethylene glycol) based capsules support ovarian tissue survival to restore endocrine function. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2018;10.1002/jbm.a.36338.
68. de Crevoisier R, Garcia R, Louvel G, Marguet M, Lafond C, Bodez V. [Cone beam CT based image guided radiotherapy: implementation and clinical use]. *Cancer radiotherapie : journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique*. 2009;13(6-7):482-9.
69. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertility and sterility*. 2002;77(2):357-62.
70. Decanter C, Robin G. [Fertility preservation strategies in young women in case of breast cancer or hematologic malignancy]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*. 2013;41(10):597-600.
71. Del Mastro L, Boni L, Michelotti A, Gamucci T, Olmeo N, Gori S, et coll. Effect of the gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial. *Jama*. 2011;306(3):269-76.
72. Del Mastro L, Catzeddu T, Boni L, Bell C, Sertoli MR, Bighin C, et coll. Prevention of chemotherapy-induced menopause by temporary ovarian suppression with goserelin in young, early breast cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2006;17(1):74-8.
73. Demeestere I, Brice P, Peccatori FA, Kentos A, Dupuis J, Zachee P, et coll. No Evidence for the Benefit of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist in Preserving Ovarian Function and Fertility in Lymphoma Survivors Treated With Chemotherapy: Final Long-Term Report of a Prospective Randomized Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(22):2568-74.
74. Demeestere I, Brice P, Peccatori FA, Kentos A, Gaillard I, Zachee P, et coll. Gonadotropin-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian failure in patients with lymphoma: 1-year follow-up of a prospective randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(7):903-9.
75. Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Moffa F, Tsepelidis S, Brachet C, et coll. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015;30(9):2107-9.
76. Desvignes F, Pouly JL, Janny L, Canis M, Sanfilippo S, Kanold J, et coll. [Cryoconservation of ovarian tissue: indications and outcome of the patients]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*. 2014;42(5):334-42.
77. Dillon KE, Gracia CR. Pediatric and young adult patients and oncofertility. *Current treatment options in oncology*. 2012;13(2):161-73.
78. Ding CC, Thong KJ, Krishna A, Telfer EE. Activin A inhibits activation of human primordial follicles in vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2010;27(4):141-7.

79. Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, et coll. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertility and sterility*. 2012;97(2):387-90.
80. Dolmans MM, Hollanders de Ouderaen S, Demylle D, Pirard C. Utilization rates and results of long-term embryo cryopreservation before gonadotoxic treatment. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(8):1233-7.
81. Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertility and sterility*. 2013;99(6):1514-22.
82. Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonck A, Amorim C, Donnez J. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood*. 2010;116(16):2908-14.
83. Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Nottola SA, et coll. Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2006;21(2):413-20.
84. Dolmans MM, Yuan WY, Camboni A, Torre A, Van Langendonck A, Martinez-Madrid B, et coll. Development of antral follicles after xenografting of isolated small human preantral follicles. *Reproductive biomedicine online*. 2008;16(5):705-11.
85. Dong FL, Ma L, Shi SL, Dai SJ, Liu XG, Su YC, et coll. An research on the isolation methods of frozen-thawed human ovarian preantral follicles. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(8):2298-303.
86. Donnez J, Dolmans MM. Fertility Preservation in Women. *The New England journal of medicine*. 2017;377(17):1657-65.
87. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(12):735-49.
88. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(8):1167-70.
89. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et coll. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet (London, England)*. 2004;364(9443):1405-10.
90. Donnez J, Dolmans MM, Diaz C, Pellicer A. Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application. *Fertility and sterility*. 2015;104(5):1097-8.
91. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, et coll. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertility and sterility*. 2013;99(6):1503-13.
92. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human reproduction update*. 2006;12(5):519-35.
93. Donnez J, Squifflet J, Jadoul P, Demylle D, Cheron AC, Van Langendonck A, et coll. Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Fertility and sterility*. 2011;95(5):1787 e1-4.
94. Dovey SL, Valli H, Hermann BP, Sukhwani M, Donohue J, Castro CA, et coll. Eliminating malignant contamination from therapeutic human spermatogonial stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1833-43.
95. Doyle JO, Richter KS, Lim J, Stillman RJ, Graham JR, Tucker MJ. Successful elective and medically indicated oocyte vitrification and warming for autologous in vitro fertilization, with

- predicted birth probabilities for fertility preservation according to number of cryopreserved oocytes and age at retrieval. *Fertility and sterility*. 2016;105(2):459-66 e2.
96. Druckenmiller S, Goldman KN, Labella PA, Fino ME, Bazzocchi A, Noyes N. Successful Oocyte Cryopreservation in Reproductive-Aged Cancer Survivors. *Obstetrics and gynecology*. 2016;127(3):474-80.
97. Dunlop CE, Brady BM, McLaughlin M, Telfer EE, White J, Cowie F, et coll. Re-implantation of cryopreserved ovarian cortex resulting in restoration of ovarian function, natural conception and successful pregnancy after haematopoietic stem cell transplantation for Wilms tumour. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(12):1615-20.
98. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, et coll. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1999;140(12):5789-96.
99. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2002;124(5):601-9.
100. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O, et coll. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2008;74(6):331-40.
101. Elgindy EA, El-Haieg DO, Khorshid OM, Ismail EI, Abdelgawad M, Sallam HN, et coll. Gonadotrophin suppression to prevent chemotherapy-induced ovarian damage: a randomized controlled trial. *Obstetrics and gynecology*. 2013;121(1):78-86.
102. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2001;122(6):829-38.
103. Eppig JJ. Further reflections on culture systems for the growth of oocytes in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1994;9(6):974-6.
104. Ernst E, Kjaersgaard M, Birkebaek NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2013;49(4):911-4.
105. Esposito S, Tenconi R, Preti V, Groppali E, Principi N. Chemotherapy against cancer during pregnancy: A systematic review on neonatal outcomes. *Medicine*. 2016;95(38):e4899.
106. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1992;7(10):1342-6.
107. Fadini R, Mignini Renzini M, Guarnieri T, Dal Canto M, De Ponti E, Sutcliffe A, et coll. Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from in vitro or in vivo matured oocytes in in vitro maturation treatments with births from conventional ICSI cycles. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(12):3601-8.
108. Falorio S, Angrilli F, Fioritoni G. Gonadotropin-releasing hormone analog treatment for the prevention of treatment-related ovarian failure and infertility in women of reproductive age with Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2008;49(6):1087-93.
109. Familiari G, Caggiati A, Nottola SA, Ermini M, Di Benedetto MR, Motta PM. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1993;8(12):2080-7.
110. Faulk DM, Johnson SA, Zhang L, Badylak SF. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(8):984-9.
111. Fauque P, Ben Amor A, Joanne C, Agnani G, Bresson JL, Roux C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertility and sterility*. 2007;87(5):1200-7.

112. Fazzina R, Mariotti A, Procoli A, Fioravanti D, Iudicone P, Scambia G, et coll. A new standardized clinical-grade protocol for banking human umbilical cord tissue cells. *Transfusion*. 2015;55(12):2864-73.
113. Ford AM, Mansur MB, Furness CL, van Delft FW, Okamura J, Suzuki T, et coll. Protracted dormancy of pre-leukemic stem cells. *Leukemia*. 2015;29(11):2202-7.
114. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal reproduction science*. 2003;78(3-4):135-63.
115. Gerber B, von Minckwitz G, Stehle H, Reimer T, Felberbaum R, Maass N, et coll. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone agonist on ovarian function after modern adjuvant breast cancer chemotherapy: the GBG 37 ZORO study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(17):2334-41.
116. Gheorghisan-Galateanu AA, Hinescu ME, Enciu AM. Ovarian adult stem cells: hope or pitfall? *Journal of ovarian research*. 2014;7:71.
117. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed research international*. 2017;2017:9831534.
118. Giuseppe L, Attilio G, Edoardo DN, Loredana G, Cristina L, Vincenzo L. Ovarian function after cancer treatment in young women affected by Hodgkin disease (HD). *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*. 2007;12(2):141-7.
119. Glujovsky D, Riestra B, Sueldo C, Fiszbajn G, Repping S, Nodar F, et coll. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;10.1002/14651858.CD010047.pub2(9):CD010047.
120. Goldman KN, Kramer Y, Hodes-Wertz B, Noyes N, McCaffrey C, Grifo JA. Long-term cryopreservation of human oocytes does not increase embryonic aneuploidy. *Fertility and sterility*. 2015;103(3):662-8.
121. Gook DA, Choo B, Bourne H, Lewis K, Edgar DH. Closed vitrification of human oocytes and blastocysts: outcomes from a series of clinical cases. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(9):1247-52.
122. Gosden RG. Programmes and prospects for ovotechnology. *Reproductive biomedicine online*. 2013;27(6):702-9.
123. Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Annales d'endocrinologie*. 2010;71(3):132-43.
124. Gougeon A. Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas*. 1998;30(2):137-42.
125. Gougeon A. [Regulation of resting follicle activation]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*. 2011;39(9):511-3.
126. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1986;1(2):81-7.
127. Gougeon A, Chainy GB. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Journal of reproduction and fertility*. 1987;81(2):433-42.
128. Green DM, Sklar CA, Boice JD, Jr., Mulvihill JJ, Whitton JA, Stovall M, et coll. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: results from the Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(14):2374-81.
129. Greve T, Schmidt KT, Kristensen SG, Ernst E, Andersen CY. Evaluation of the ovarian reserve in women transplanted with frozen and thawed ovarian cortical tissue. *Fertility and sterility*. 2012;97(6):1394-8 e1.

130. Grieve KM, McLaughlin M, Dunlop CE, Telfer EE, Anderson RA. The controversial existence and functional potential of oogonial stem cells. *Maturitas*. 2015;82(3):278-81.
131. Grive KJ, Freiman RN. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development (Cambridge, England)*. 2015;142(15):2554-63.
132. Gubbala K, Laios A, Gallos I, Pathiraja P, Haldar K, Ind T. Outcomes of ovarian transposition in gynaecological cancers; a systematic review and meta-analysis. *Journal of ovarian research*. 2014;7:69.
133. Guzel Y, Oktem O. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? *Molecular reproduction and development*. 2017;84(7):544-59.
134. Han SS, Kim YH, Lee SH, Kim GJ, Kim HJ, Kim JW, et coll. Underuse of ovarian transposition in reproductive-aged cancer patients treated by primary or adjuvant pelvic irradiation. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2011;37(7):825-9.
135. Hannon PR, Flaws JA. The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in endocrinology*. 2015;6:8.
136. Hawkins SM, Matzuk MM. The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1135:10-8.
137. Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1994;9(2):188-91.
138. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International review of cytology*. 1991;124:43-101.
139. Hoffmann H, Siebeck M, Thetter O, Fink E, Philipitsch A. Effect of aprotinin and C1-esterase inhibitor on activation of the plasma kallikrein-kinin system in vivo. *Progress in clinical and biological research*. 1987;236A:159-64.
140. Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2012;27(6):1801-10.
141. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1997;12(5):1032-6.
142. Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K, Winston RM. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1999;14(10):2519-24.
143. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(1):316-21.
144. Huser M, Crha I, Ventruba P, Hudecek R, Zakova J, Smardova L, et coll. Prevention of ovarian function damage by a GnRH analogue during chemotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2008;23(4):863-8.
145. Imai A, Sugiyama M, Furu T, Tamaya T, Ohno T. Direct protection by a gonadotropin-releasing hormone analog from doxorubicin-induced granulosa cell damage. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2007;63(2):102-6.
146. Irtan S, Orbach D, Helfre S, Sarnacki S. Ovarian transposition in prepubescent and adolescent girls with cancer. *The Lancet Oncology*. 2013;14(13):e601-8.
147. Jadoul P, Dolmans MM, Donnez J. Fertility preservation in girls during childhood: is it feasible, efficient and safe and to whom should it be proposed? *Human reproduction update*. 2010;16(6):617-30.

148. Jahnukainen K, Tinkanen H, Wikstrom A, Dunkel L, Saarinen-Pihkala UM, Makinen S, et coll. Bone marrow remission status predicts leukemia contamination in ovarian biopsies collected for fertility preservation. *Leukemia*. 2013;27(5):1183-5.
149. Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT, Jeppesen JV, Fedder J, Ernst E, et coll. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015;30(12):2838-45.
150. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34(3):325-36.
151. Jung D, Xiong J, Ye M, Qin X, Li L, Cheng S, et coll. In vitro differentiation of human embryonic stem cells into ovarian follicle-like cells. *Nature communications*. 2017;8:15680.
152. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, et coll. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Science translational medicine*. 2013;5(185):185ra62.
153. Kawamura K, Cheng Y, Sun YP, Zhai J, Diaz-Garcia C, Simon C, et coll. Ovary transplantation: to activate or not to activate. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015;30(11):2457-60.
154. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et coll. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(43):17474-9.
155. Kedem A, Hourvitz A, Fisch B, Shachar M, Cohen S, Ben-Haroush A, et coll. Alginate scaffold for organ culture of cryopreserved-thawed human ovarian cortical follicles. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28(9):761-9.
156. Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, et coll. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2009;24(7):1670-83.
157. Kerr JB, Myers M, Anderson RA. The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2013;146(6):R205-15.
158. Khosravi F, Reid RL, Moini A, Abolhassani F, Valojerdi MR, Kan FW. In vitro development of human primordial follicles to preantral stage after vitrification. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(11):1397-406.
159. Kim SY, Cordeiro MH, Serna VA, Ebbert K, Butler LM, Sinha S, et coll. Rescue of platinum-damaged oocytes from programmed cell death through inactivation of the p53 family signaling network. *Cell death and differentiation*. 2013;20(8):987-97.
160. Kim SY, Kim SK, Lee JR, Woodruff TK. Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women. *Journal of gynecologic oncology*. 2016;27(2):e22.
161. Klocke S, Bundgen N, Koster F, Eichenlaub-Ritter U, Griesinger G. Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2015;291(2):419-26.
162. Kniazeva E, Hardy AN, Boukaidi SA, Woodruff TK, Jeruss JS, Shea LD. Primordial Follicle Transplantation within Designer Biomaterial Grafts Produce Live Births in a Mouse Infertility Model. *Scientific reports*. 2015;5:17709.
163. Kristensen SG, Giorgione V, Humaidan P, Alsbjerg B, Bjorn AB, Ernst E, et coll. Fertility preservation and refreezing of transplanted ovarian tissue—a potential new way of managing patients with low risk of malignant cell recurrence. *Fertility and sterility*. 2017;107(5):1206-13.

164. Kristensen SG, Rasmussen A, Byskov AG, Andersen CY. Isolation of pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011;26(1):157-66.
165. Krotz SP, Robins JC, Ferruccio TM, Moore R, Steinhoff MM, Morgan JR, et coll. In vitro maturation of oocytes via the pre-fabricated self-assembled artificial human ovary. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2010;27(12):743-50.
166. Kyono K, Doshida M, Toya M, Sato Y, Akahira J, Sasano H. Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5,571 autopsy findings of females under the age of 40 in Japan. *Fertility and sterility*. 2010;93(7):2429-30.
167. La loi (n°2004-800) relative à la bioéthique. Loi (n°2004-800) du 6 août 2004 relative à la bioéthique, 2004 [cited 2004]. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000441469&dateTexte=20040807>.
168. La loi (n°2011-814) relative à la bioéthique. Article 2141-11 modifié par la Loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique 2011 [cited 2011]. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2011/7/7/ETSX1117652L/jo/texte>.
169. Ladanyi C, Mor A, Christianson MS, Dhillon N, Segars JH. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34(6):709-22.
170. Lanman JT, Bierman HR, Byron RL, Jr. Transfusion of leukemic leukocytes in man; hematologic and physiologic changes. *Blood*. 1950;5(12):1099-113.
171. Laronda MM, Duncan FE, Hornick JE, Xu M, Pahnke JE, Whelan KA, et coll. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(8):1013-28.
172. Laronda MM, Jakus AE, Whelan KA, Wertheim JA, Shah RN, Woodruff TK. Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant. *Biomaterials*. 2015;50:20-9.
173. Laronda MM, Rutz AL, Xiao S, Whelan KA, Duncan FE, Roth EW, et coll. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nature communications*. 2017;8:15261.
174. Leghari IH, Zhao D, Mi Y, Zhang C. Isolation and culture of chicken primordial follicles. *Poultry science*. 2015;94(10):2576-80.
175. Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens T, Smits J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biology of reproduction*. 2004;71(5):1730-8.
176. Leonard RC, Barrett-Lee PJ, Gosney MA, Willett AM, Reed MW, Hammond PJ. Effect of patient age on management decisions in breast cancer: consensus from a national consultation. *The oncologist*. 2010;15(7):657-64.
177. Li F, Turan V, Lierman S, Cuvelier C, De Sutter P, Oktay K. Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2014;29(1):107-13.
178. Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, et coll. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(22):10280-4.
179. Lierman S, Tilleman K, Cornelissen M, De Vos WH, Weyers S, T'Sjoen G, et coll. Follicles of various maturation stages react differently to enzymatic isolation: a comparison of different isolation protocols. *Reproductive biomedicine online*. 2015;30(2):181-90.
180. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C. Improved human islet isolation using a new enzyme blend, liberase. *Diabetes*. 1997;46(7):1120-3.

181. Lintern-Moore S, Moore GP. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biology of reproduction*. 1979;20(4):773-8.
182. Liu T, Li Q, Wang S, Chen C, Zheng J. Transplantation of ovarian granulosa-like cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. *Molecular medicine reports*. 2016;13(6):5053-8.
183. Lotz L, Montag M, van der Ven H, von Wolff M, Mueller A, Hoffmann I, et coll. Xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with ovarian tumors into SCID mice--no evidence of malignant cell contamination. *Fertility and sterility*. 2011;95(8):2612-4 e1.
184. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Legat C, Fortuno Moya C, Donnez J, et coll. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertility and sterility*. 2014;101(4):1149-56.
185. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Scalerio SR, Donnez J, Amorim CA. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. *Journal of ovarian research*. 2013;6(1):83.
186. Man L, Park L, Bodine R, Ginsberg M, Zaninovic N, Man OA, et coll. Engineered endothelium provides angiogenic and paracrine stimulus to grafted human ovarian tissue. *Scientific reports*. 2017;7(1):8203.
187. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertility and sterility*. 2004;82(5):1390-4.
188. Martinez-Madrid B, Donnez J. Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle--or cryopreservation of hemiovaries? *Human reproduction (Oxford, England)*. 2007;22(6):1795-6; author reply 6-7.
189. Martinez M, Rabadan S, Domingo J, Cobo A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Obstetric outcome after oocyte vitrification and warming for fertility preservation in women with cancer. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(6):722-8.
190. Martins da Silva SJ, Bayne RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly AS, Anderson RA. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Developmental biology*. 2004;266(2):334-45.
191. Mayerhofer K, Ott J, Nouri K, Stoegbauer L, Fischer EM, Lipovac M, et coll. Laparoscopic ovarian tissue harvesting for cryopreservation: an effective and safe procedure for fertility preservation. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2010;152(1):68-72.
192. McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biology of reproduction*. 2000;63(1):267-73.
193. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*. 2000;21(2):200-14.
194. McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Molecular human reproduction*. 2018;24(3):135-42.
195. McLaughlin M, Kinnell HL, Anderson RA, Telfer EE. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Molecular human reproduction*. 2014;20(8):736-44.

196. McLaughlin M, Patrizio P, Kayisli U, Luk J, Thomson TC, Anderson RA, et coll. mTOR kinase inhibition results in oocyte loss characterized by empty follicles in human ovarian cortical strips cultured in vitro. *Fertility and sterility*. 2011;96(5):1154-9 e1.
197. Meiorow D, Hardan I, Dor J, Fridman E, Elizur S, Ra'anani H, et coll. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2008;23(5):1007-13.
198. Meiorow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et coll. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2005;353(3):318-21.
199. Meiorow D, Ra'anani H, Shapira M, Brenghausen M, Derech Chaim S, Aviel-Ronen S, et coll. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertility and sterility*. 2016;106(2):467-74.
200. Meyer LH, Debatin KM. Diversity of human leukemia xenograft mouse models: implications for disease biology. *Cancer research*. 2011;71(23):7141-4.
201. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2001;122(4):587-92.
202. Miyazaki K, Maruyama T. Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. *Biomaterials*. 2014;35(31):8791-800.
203. Mizunuma H, Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, et coll. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology*. 1999;140(1):37-42.
204. Moore HC, Unger JM, Phillips KA, Boyle F, Hitre E, Porter D, et coll. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2015;372(10):923-32.
205. Moreno I, Miguez-Forjan JM, Simon C. Artificial gametes from stem cells. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2015;42(2):33-44.
206. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Human reproduction update*. 2012;18(5):525-35.
207. Morgan S, Lopes F, Gourley C, Anderson RA, Spears N. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PloS one*. 2013;8(7):e70117.
208. Motamed M, Sadr Z, Valojerdi MR, Moini A, Oryan S, Totonchi M, et coll. Tissue Engineered Human Amniotic Membrane Application in Mouse Ovarian Follicular Culture. *Annals of biomedical engineering*. 2017;45(7):1664-75.
209. Munster PN, Moore AP, Ismail-Khan R, Cox CE, Lacevic M, Gross-King M, et coll. Randomized trial using gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin for the preservation of ovarian function during (neo)adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(5):533-8.
210. Nitzschke M, Raddatz J, Bohlmann MK, Stute P, Strowitzki T, von Wolff M. GnRH analogs do not protect ovaries from chemotherapy-induced ultrastructural injury in Hodgkin's lymphoma patients. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2010;282(1):83-8.
211. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reproductive biomedicine online*. 2009;18(6):769-76.
212. Oktay K. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Human reproduction (Oxford, England)*. 2006;21(6):1345-8.

213. Oktay K, Bedoschi G, Pacheco F, Turan V, Emirdar V. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016;214(1):94 e1-9.
214. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2006;86(1):70-80.
215. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *The New England journal of medicine*. 2000;342(25):1919.
216. Oktay K, Rodriguez-Wallberg K, Munster P. Ovarian protection during adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2015;372(23):2268-9.
217. Oktay K, Turkcuoglu I, Rodriguez-Wallberg KA. Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: what is the explanation? *Fertility and sterility*. 2011;95(2):804 e7-10.
218. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1127:1-9.
219. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2010;25(12):2944-54.
220. Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Therapeutic advances in hematology*. 2016;7(1):3-16.
221. Pacheco F, Oktay K. Current Success and Efficiency of Autologous Ovarian Transplantation: A Meta-Analysis. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2017;24(8):1111-20.
222. Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertility and sterility*. 2012;98(4):870-5.
223. Parte S, Bhartiya D, Patel H, Daithankar V, Chauhan A, Zaveri K, et coll. Dynamics associated with spontaneous differentiation of ovarian stem cells in vitro. *Journal of ovarian research*. 2014;7:25.
224. Paulini F, Vilela JM, Chiti MC, Donnez J, Jadoul P, Dolmans MM, et coll. Survival and growth of human preantral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicle isolation and short-term xenografting. *Reproductive biomedicine online*. 2016;33(3):425-32.
225. Pelosi E, Forabosco A, Schlessinger D. Genetics of the ovarian reserve. *Frontiers in genetics*. 2015;6:308.
226. Pereyra Pacheco B, Mendez Ribas JM, Milone G, Fernandez I, Kvicala R, Mila T, et coll. Use of GnRH analogs for functional protection of the ovary and preservation of fertility during cancer treatment in adolescents: a preliminary report. *Gynecologic oncology*. 2001;81(3):391-7.
227. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nature medicine*. 1997;3(11):1228-32.
228. Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*. 2001;55(6):1193-210.
229. Piver P, Amiot C, Agnani G, Pech J, Rohrlich P, Vidal E, et coll. Two pregnancies obtained after a new technique of autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Human reproduction (Oxford, England)* 2009. p. i15.
230. Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9815):588.
231. Poirot C, Sitbon L, Fortin A, Berthaut I, Jaudi S, Anastacio A, et coll. [Fertility and cancer]. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*. 2013;42(11):1513-20.

232. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and sterility*. 2013;99(1):37-43.
233. Prigione A, Lichtner B, Kuhl H, Struys EA, Wamelink M, Lehrach H, et coll. Human induced pluripotent stem cells harbor homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA mutations while maintaining human embryonic stem cell-like metabolic reprogramming. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2011;29(9):1338-48.
234. Rauff S, Giorgione V, Andersen CY. Potential malignant cell contamination in transplanted ovarian tissue. *Expert opinion on biological therapy*. 2016;16(3):285-9.
235. Recchia F, Saggio G, Amiconi G, Di Blasio A, Cesta A, Candeloro G, et coll. Gonadotropin-releasing hormone analogues added to adjuvant chemotherapy protect ovarian function and improve clinical outcomes in young women with early breast carcinoma. *Cancer*. 2006;106(3):514-23.
236. Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21(2):96-103.
237. Règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation. Arrêté du 30 juin 2017 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 modifié relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation 2017 [cited 2017]. Available from: https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/20170630_rbpamp.pdf.
238. Revel A, Laufer N, Ben Meir A, Lebovich M, Mitrani E. Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: a case report. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011;26(5):1097-103.
239. Revelli A, Marchino G, Dolfin E, Molinari E, Delle Piane L, Salvagno F, et coll. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. *Fertility and sterility*. 2013;99(1):227-30.
240. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2003;126(4):415-24.
241. Rodriguez-Wallberg KA, Karlstrom PO, Rezapour M, Castellanos E, Hreinsson J, Rasmussen C, et coll. Full-term newborn after repeated ovarian tissue transplants in a patient treated for Ewing sarcoma by sterilizing pelvic irradiation and chemotherapy. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2015;94(3):324-8.
242. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2012a;26(3):391-405.
243. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Options on fertility preservation in female cancer patients. *Cancer treatment reviews*. 2012b;38(5):354-61.
244. Rodriguez-Wallberg KA, Tanbo T, Tinkanen H, Thurin-Kjellberg A, Nedstrand E, Kitlinski ML, et coll. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation among alternatives for fertility preservation in the Nordic countries - compilation of 20 years of multicenter experience. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2016;95(9):1015-26.
245. Rosendahl M, Andersen MT, Ralfkiaer E, Kjeldsen L, Andersen MK, Andersen CY. Evidence of residual disease in cryopreserved ovarian cortex from female patients with leukemia. *Fertility and sterility*. 2010;94(6):2186-90.
246. Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(1):11-24.
247. Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrlich PS, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertility and sterility*. 2010;93(7):2413 e15-9.

248. Salama M, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Mallmann P. Updates in preserving reproductive potential of prepubertal girls with cancer: Systematic review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016;103:10-21.
249. Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escriba MJ, Simon C, et coll. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertility and sterility*. 2010;93(1):268 e11-3.
250. Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, et coll. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood*. 1996;87(7):3045-52.
251. Sanfilippo S, Canis M, Ouchchane L, Botchorishvili R, Artonne C, Janny L, et coll. Viability assessment of fresh and frozen/thawed isolated human follicles: reliability of two methods (Trypan blue and Calcein AM/ethidium homodimer-1). *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28(12):1151-6.
252. Scalercio SR, Brito AB, Domingues SF, Santos RR, Amorim CA. Immunolocalization of growth, inhibitory, and proliferative factors involved in initial ovarian folliculogenesis from adult common squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2015;22(1):68-74.
253. Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2015;3:43.
254. Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Muller J, Yding Andersen C. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2003;18(6):1158-64.
255. Schroder CP, Timmer-Bosscha H, Wijchman JG, de Leij LF, Hollema H, Heineman MJ, et coll. An in vitro model for purging of tumour cells from ovarian tissue. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2004;19(5):1069-75.
256. Segers I, Mateizel I, Van Moer E, Smitz J, Tournaye H, Verheyen G, et coll. In vitro maturation (IVM) of oocytes recovered from ovariectomy specimens in the laboratory: a promising "ex vivo" method of oocyte cryopreservation resulting in the first report of an ongoing pregnancy in Europe. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(8):1221-31.
257. Shapira M, Raanani H, Barshack I, Amariglio N, Derech-Haim S, Marciano MN, et coll. First delivery in a leukemia survivor after transplantation of cryopreserved ovarian tissue, evaluated for leukemia cells contamination. *Fertility and sterility*. 2018;109(1):48-53.
258. Shea LD, Woodruff TK, Shikanov A. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. *Annual review of biomedical engineering*. 2014;16:29-52.
259. Shikanov A, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials*. 2009;30(29):5476-85.
260. Shikanov A, Zhang Z, Xu M, Smith RM, Rajan A, Woodruff TK, et coll. Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovarian graft survival in mice. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(23-24):3095-104.
261. Silber S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(12):1595-603.
262. Silber S, Pineda J, Lenahan K, DeRosa M, Melnick J. Fresh and cryopreserved ovary transplantation and resting follicle recruitment. *Reproductive biomedicine online*. 2015;30(6):643-50.
263. Silber SJ, Grudzinskas G, Gosden RG. Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. *The New England journal of medicine*. 2008;359(24):2617-8.
264. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human reproduction update*. 2005;11(5):461-71.

265. Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et coll. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertility and sterility*. 2010;94(6):2088-95.
266. Smitz J, Cortvrindt R. Oocyte in-vitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1999;14 Suppl 1:145-61.
267. Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2002;123(2):185-202.
268. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, Saussoy P, Donnez J, Dolmans MM. Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. *Fertility and sterility*. 2015a;104(3):672-80 e2.
269. Soares M, Sahrari K, Chiti MC, Amorim CA, Ambroise J, Donnez J, et coll. The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: medulla or cortex, cryopreserved or fresh? *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015b;30(7):1589-98.
270. Soares M, Saussoy P, Maskens M, Reul H, Amorim CA, Donnez J, et coll. Eliminating malignant cells from cryopreserved ovarian tissue is possible in leukaemia patients. *British journal of haematology*. 2017;178(2):231-9.
271. Soares M, Saussoy P, Sahrari K, Amorim CA, Donnez J, Dolmans MM. Is transplantation of a few leukemic cells inside an artificial ovary able to induce leukemia in an experimental model? *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015c;32(4):597-606.
272. Somers EC, Marder W, Christman GM, Ognenovski V, McCune WJ. Use of a gonadotropin-releasing hormone analog for protection against premature ovarian failure during cyclophosphamide therapy in women with severe lupus. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(9):2761-7.
273. Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G, et coll. Delivery of twins following heterotopic grafting of frozen-thawed ovarian tissue. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2014;29(8):1828.
274. Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G, et coll. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2013;28(11):2996-9.
275. Sudour-Bonnange H, Tabone MD, Thomas-Teinturier C, Pacquement H, Oberlin O, Marec-Berard P, et coll. [Fertility preservation in children and teenagers with cancer]. *Bulletin du cancer*. 2013;100(7-8):727-35.
276. Suzuki N, Donnez J. *Gonadal tissue cryopreservation in fertility preservation*: Springer; 2016.
277. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et coll. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015;30(3):608-15.
278. Sverrisdottir A, Nystedt M, Johansson H, Fornander T. Adjuvant goserelin and ovarian preservation in chemotherapy treated patients with early breast cancer: results from a randomized trial. *Breast cancer research and treatment*. 2009;117(3):561-7.
279. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
280. Tanbo T, Greggains G, Storeng R, Busund B, Langebrekke A, Fedorcsak P. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue after treatment for malignant disease - the first Norwegian results. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2015;94(9):937-41.
281. Telfer EE, McLaughlin M. Strategies to support human oocyte development in vitro. *The International journal of developmental biology*. 2012;56(10-12):901-7.

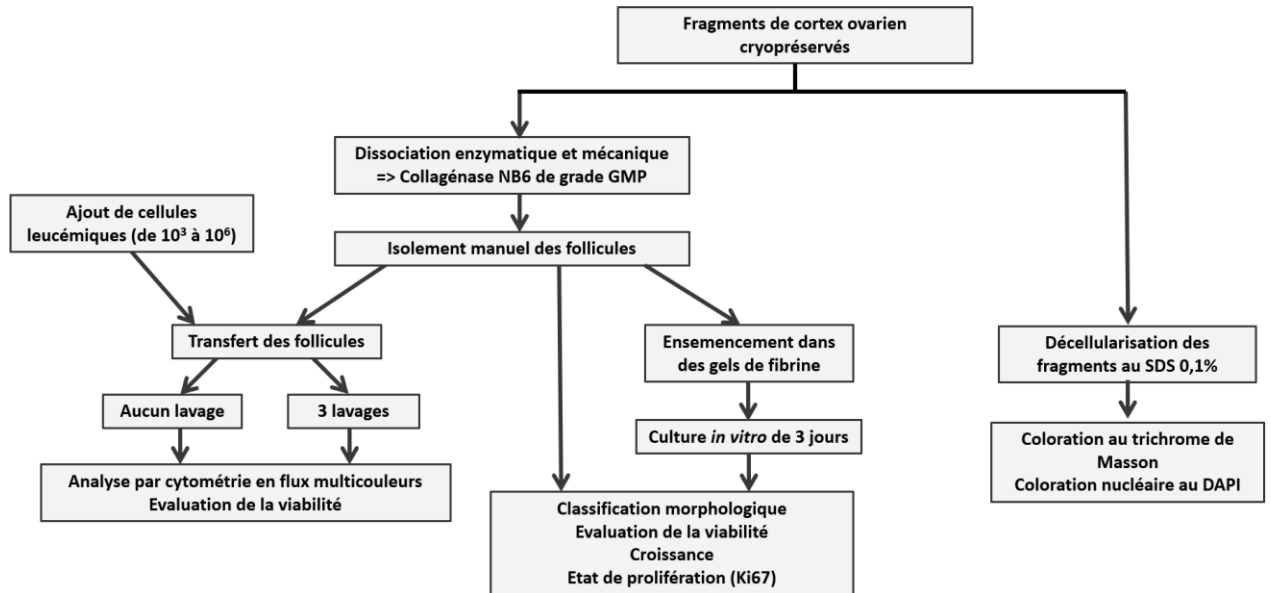
282. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2008;23(5):1151-8.
283. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertility and sterility*. 2013;99(6):1523-33.
284. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et coll. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(3):347-57.
285. Thomson AB, Critchley HO, Kelnar CJ, Wallace WH. Late reproductive sequelae following treatment of childhood cancer and options for fertility preservation. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2002;16(2):311-34.
286. Thorne JT, Segal TR, Chang S, Jorge S, Segars JH, Leppert PC. Dynamic reciprocity between cells and their microenvironment in reproduction. *Biology of reproduction*. 2015;92(1):25.
287. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertility and sterility*. 1994;62(2):353-62.
288. Turner NH, Partridge A, Sanna G, Di Leo A, Biganzoli L. Utility of gonadotropin-releasing hormone agonists for fertility preservation in young breast cancer patients: the benefit remains uncertain. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(9):2224-35.
289. Urruticoechea A, Arnedos M, Walsh G, Dowsett M, Smith IE. Ovarian protection with goserelin during adjuvant chemotherapy for pre-menopausal women with early breast cancer (EBC). *Breast cancer research and treatment*. 2008;110(3):411-6.
290. Uzelac PS, Delaney AA, Christensen GL, Bohler HC, Nakajima ST. Live birth following in vitro maturation of oocytes retrieved from extracorporeal ovarian tissue aspiration and embryo cryopreservation for 5 years. *Fertility and sterility*. 2015;104(5):1258-60.
291. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003;17(6):1013-34.
292. Van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krussel J, et coll. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2016;31(9):2031-41.
293. Van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J, et coll. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fertility and sterility*. 2010;93(5):1676-85.
294. Vanacker J, Amorim CA. Alginate: A Versatile Biomaterial to Encapsulate Isolated Ovarian Follicles. *Annals of biomedical engineering*. 2017;45(7):1633-49.
295. Vanacker J, Camboni A, Dath C, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J, et coll. Enzymatic isolation of human primordial and primary ovarian follicles with Liberase DH: protocol for application in a clinical setting. *Fertility and sterility*. 2011;96(2):379-83 e3.
296. Vanacker J, Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Amorim CA. First transplantation of isolated murine follicles in alginate. *Regenerative medicine*. 2014;9(5):609-19.
297. Vanacker J, Luyckx V, Amorim C, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, et coll. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? *Fertility and sterility*. 2013;99(5):1363-8 e2.

298. Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM, Des Rieux A, Jaeger J, Van Langendonck A, et coll. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials*. 2012;33(26):6079-85.
299. Visser J. [Role of anti-Mullerian hormone in follicle recruitment and maturation]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction*. 2006;35(5 Pt 2):2S30-2S4.
300. von Wolff M, Stute P, Fluck C. Autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue to induce puberty-the endocrinologists' view. *European journal of pediatrics*. 2016;175(12):2007-10.
301. Wagner A, Jhingran A, Gaffney D. Intensity modulated radiotherapy in gynecologic cancers: hope, hype or hyperbole? *Gynecologic oncology*. 2013;130(1):229-36.
302. Wallace WH, Shalet SM, Hendry JH, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *The British journal of radiology*. 1989;62(743):995-8.
303. Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2003;18(1):117-21.
304. Walls ML, Douglas K, Ryan JP, Tan J, Hart R. In-vitro maturation and cryopreservation of oocytes at the time of oophorectomy. *Gynecologic oncology reports*. 2015;13:79-81.
305. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(2):83-103.
306. Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PF, Gregory W, Shalet S, et coll. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1987;19(2):159-62.
307. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et coll. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular human reproduction*. 2004;10(2):77-83.
308. White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature medicine*. 2012;18(3):413-21.
309. Wong M, O'Neill S, Walsh G, Smith IE. Goserelin with chemotherapy to preserve ovarian function in pre-menopausal women with early breast cancer: menstruation and pregnancy outcomes. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(1):133-8.
310. Xia X, Yin T, Yan J, Yan L, Jin C, Lu C, et coll. Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis and Follicle Survival in Human Cryopreserved Ovarian Cortex Transplantation. *Cell transplantation*. 2015;24(10):1999-2010.
311. Xu J, Bernuci MP, Lawson MS, Yeoman RR, Fisher TE, Zelinski MB, et coll. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2010;140(5):685-97.
312. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Molskness TA, Ting AY, Stouffer RL, et coll. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2013;28(8):2187-200.
313. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, Kondapalli LA, Kiesewetter SE, Shea LD, et coll. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2009;24(10):2531-40.

314. Yin H, Jiang H, Kristensen SG, Andersen CY. Vitrification of in vitro matured oocytes collected from surplus ovarian medulla tissue resulting from fertility preservation of ovarian cortex tissue. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016a;33(6):741-6.
315. Yin H, Kristensen SG, Jiang H, Rasmussen A, Andersen CY. Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2016b;31(7):1531-9.
316. Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, et coll. In Vitro Activation of Follicles and Fresh Tissue Auto-transplantation in Primary Ovarian Insufficiency Patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101(11):4405-12.
317. Zhao J, Taverne MA, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biology of reproduction*. 2001;65(3):967-77.
318. Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;356(1-2):24-30.
319. Zver T, Alvergnas-Vieille M, Garnache-Ottou F, Ferrand C, Roux C, Amiot C. Minimal residual disease detection in cryopreserved ovarian tissue by multicolor flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014;99(12):e249-52.
320. Zver T, Alvergnas-Vieille M, Garnache-Ottou F, Roux C, Amiot C. A new method for evaluating the risk of transferring leukemic cells with transplanted cryopreserved ovarian tissue. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(8):1263-6.
321. Zver T, Mouloungui E, Berdin A, Roux C, Amiot C. Validation of an automated technique for ovarian cortex dissociation: isolation of viable ovarian cells and their qualification by multicolor flow cytometry. *Journal of ovarian research*. 2017;10(1):38.

ANNEXES

Annexe 1



Plan expérimental de l'étude.

Annexe 2

Articles scientifiques.

RESEARCH

Open Access



A protocol to isolate and qualify purified human preantral follicles in cases of acute leukemia, for future clinical applications

Elodie Mouloungui¹, Tristan Zver^{1,3}, Christophe Roux^{1,2,3} and Clotilde Amiot^{1,2,3*}

Abstract

Background: Autotransplantation of cryopreserved ovarian cortex can be associated with a risk of cancer cell reseeded. This issue could be eliminated by grafting isolated preantral follicles. Collagenase NB6 is an enzyme produced under good manufacturing practices (GMP) in compliance with requirements for tissue engineering and transplantation in humans and thus can be used to isolate preantral follicles from ovarian tissue in the framework of further clinical applications. Multicolor flow cytometry is an effective tool to evaluate the potential contamination of follicular suspensions by leukemic cells.

Methods: The efficiency of collagenase NB6 was evaluated in comparison to collagenase type IA and Liberase DH, in terms of yield, morphology and viability. A short-term in vitro culture of follicles isolated with collagenase NB6 was conducted for 3 days in a fibrin matrix. A modelization procedure was carried out to detect the presence of leukemic cells in follicular suspensions using multicolor flow cytometry (MFC).

Results: No statistical differences were found between collagenase NB6, Liberase DH ($p = 0.386$) and collagenase type IA ($p = 0.171$) regarding the number of human preantral follicles isolated. The mean diameter of isolated follicles was significantly lower with collagenase NB6 ($p < 0.0001$). The survival rate of isolated follicles was 93.4% ($n = 272$) using collagenase NB6 versus 94.9% ($n = 198$) with Liberase DH and 92.6% ($n = 298$) using collagenase type IA. Even after 3 days of in vitro culture in a fibrin scaffold, most of the isolated follicles were still alive after using collagenase NB6 (90.7% of viable follicles; $n = 339$). The rate of isolated Ki67-positive follicles was $29 \pm 9.19\%$ before culture and $45 \pm 1.41\%$ after 3 days. In 23 out of 24 follicular suspensions analyzed, the detection of leukemic cells by MFC was negative. The purification had no significant impact on follicle viability.

Conclusion: The isolation and purification of human preantral follicles were performed following good manufacturing practices for cell therapy. Multicolor flow cytometry was able to confirm that final follicular suspensions were free from leukemic cells. This safe isolation technique using collagenase NB6 can be considered for future clinical applications.

Keywords: Collagenase NB6, Good manufacturing practices, Human follicle isolation, Leukemic cell purification

Background

Over the past 30 years, the survival rate of cancer patients has drastically improved thanks to early diagnosis, advances in surgery procedures and adjuvant therapies [1, 2]. Due to their toxicity, chemo- and radio-therapies can lead to side

effects that affect the quality of life of those patients. Indeed, the risk of premature ovarian failure and infertility is important and varies depending on the age of the patient, type of drug, drug dose, protocol used, treatment duration and disease severity [3, 4]. For women diagnosed with cancer, desire to have a child is a major concern [5]. For this reason, techniques of fertility preservation have gained interest. Ovarian tissue cryopreservation is one of the available options to preserve fertility in women when the administration of a highly gonadotoxic treatment cannot be delayed and for prepubertal girls [6, 7]. Currently the re-use

* Correspondence: clotilde.amiot@univ-fcomte.fr

¹University Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génétique, F-25000 Besançon, France

²INSERM CIC-1431, University Hospital of Besançon, Clinical Investigation Center in Biotherapy, F-25000 Besançon, France

Full list of author information is available at the end of the article



of frozen/thawed ovarian tissue, which can only be performed by autograft, has led to more than a hundred live births worldwide [7, 8].

However, in some cases of malignant disease, ovarian tissue transplantation is associated with a high risk of cancer reseeded [9–13]. The most common cancer in prepubertal girls is leukemia, with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) accounting for 85 and 15% of cases, respectively [2]. Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) [10, 14], multicolor flow cytometry (MFC) [15–18] and ovarian tissue xenografts in immunodeficient mice [11, 19] are techniques proposed for the detection of minimal residual disease (MRD) in cryopreserved ovarian tissue.

Several alternatives to autograft of frozen/thawed ovarian tissue, such as the development of an engineered artificial ovary using mainly fibrin or alginate scaffolds [19–28], or in vitro folliculogenesis [29–39], were investigated based on the use of isolated preantral follicles, mostly primordial follicles. Primordial follicles are encapsulated in a basement membrane of collagen IV, laminin and to a lesser extent fibronectin [40]. Culturing isolated follicles separates them from surrounding stromal elements like capillaries, white blood cells and nerves and thus protects them from the risk of contamination with malignant cells, as cancerous cells are not located inside follicles but in the stroma [41].

In order to isolate follicles, techniques that consist of mechanical and/or enzymatic digestion of human cryopreserved ovarian tissue have been developed [37, 38, 42–45]. For clinical purposes, a highly-purified enzyme, free of endotoxins, must be used. Lierman et al., have compared the efficiency of Liberase DH, a purified good manufacturing practices (GMP) grade blend enzyme, to the first generation of Liberases (Liberase TM) and to collagenase IV [46]: these authors showed that Liberase DH allows isolation of viable primordial and primary follicles of higher quality and with good morphology and no sign of apoptosis, but the follicular yield was lower with Liberase DH than collagenase IV. Collagenases NB1 and NB6 are blends of GMP grade enzymes, which have been validated for their clinical applications; the highly purified collagenase NB1 has been used to isolate human pancreatic islets. When comparing the efficiency of Liberase DH and collagenase NB1, isolation yield and purity were found to be significantly higher with collagenase NB1, and in vitro function was well preserved [47]. Collagenase NB6, which is composed of collagenase type I and II, has also successfully been used in a clinical-grade protocol for the isolation of human umbilical cord tissue cells [48]. GMP grade collagenases NB1 and NB6 have shown their efficiency in different types of tissue but have not yet been tested for human ovarian follicle isolation.

Before considering the use of isolated human primordial follicles in patients with a risk of cancer reseeded, we have

to ensure that the suspension containing isolated follicles is free of malignant cells. Soares et al., have developed a model of artificial addition of leukemic cell lines to suspensions obtained from ovarian cortical strip dissociation [42]. RT-qPCR was performed using the molecular marker BCR-ABL to detect the risk of ovarian residual disease. Even though few leukemic cells were retrieved during follicle pickup, they showed that three washes were sufficient to reduce the amount of leukemic cells detected in ovarian suspensions as the RT-qPCR was negative in all cases. In a recent study, Soares et al. found that 66% of malignant cells were present in cryopreserved ovarian tissue from 9 leukemia patients [49]. However, they confirmed by RT-qPCR analyses that three washes were able to eradicate malignant cells in follicular suspensions obtained from cryopreserved ovarian tissue of leukemia patients.

Multicolor flow cytometry (MFC), based on leukemic cell immunophenotype detection, is the only applicable technique when molecular markers are not available, and thus could be potentially applied to all leukemic patients [17]. MFC is able to detect one positive cell, but in hematology a significant abnormal cell population is defined as a homogeneous cluster of at least 20 LAIP+ (Leukemia-Associated ImmunoPhenotype positive) cells, referring to the common cut-off level used for the assessment of minimal residual disease in blood or bone marrow [50].

The aim of our study was first to evaluate the efficiency, in term of follicle yield, proliferation and viability, of an isolation technique using the highly purified GMP grade blend enzyme collagenase NB6, and second to ensure that the ovarian suspension containing isolated follicles is free of malignant cells after the initial addition of leukemic cells using MFC.

Methods

Collection of ovarian tissue

Ovarian biopsies (weight: mean = 63.36 ± 30.49 mg; range = 13.9–171.2 mg; $n = 43$) were obtained from 16 women aged between 25 and 37 (mean age = 29.88 years) undergoing laparoscopic ovarian drilling for polycystic ovary syndrome. Human ovarian tissue obtained from laparoscopic drilling performed for treatment of women suffering from polycystic ovary syndrome has been used as reference tissue for our research for several years [51]. Ovarian cortical fragments were obtained using biopsy grasping forceps from an avascular portion of the ovary, before electrocoagulation of the puncture site. Specimens were then immediately transported to the laboratory in Leibovitz L-15° medium (Eurobio, France) on ice.

Freezing/thawing of ovarian tissue

Cortical fragments were transferred in 1.8 ml cryovials (VWR, France) containing 1.5 ml of a freezing solution

composed of 1.5 M dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, France) and 0.1 M sucrose (Pharmacy of Besançon University Hospital, France) in Leibovitz L-15[®] supplemented with 10% decomplexed AB human serum (Etablissement Français du Sang, Bourgogne Franche-Comté, France). Frozen/thawed AB human serum was obtained from consenting male donors. Decomplementation was carried out by a 30-min incubation at 56 °C, and the decomplexed AB human serum obtained was then stored at 4 °C.

Cortical fragments in freezing solutions were incubated for 30 min on ice while gently rotated. Cortical biopsies were frozen according to a protocol using slow cooling with manual seeding in a programmable freezer (Planer[®] 360 or 560; Cryobiosystem, France) and stored in liquid nitrogen [51].

Cortical fragments were thawed according to a protocol previously described in the laboratory [52]. Briefly, the cryovials were warmed for 5 min in a heat chamber at 37 °C, ovarian tissue pieces were then washed in decreased solutions of DMSO 1.5 M (5 min), 1 M (5 min), 0.5 M (10 min) containing 0.05 M sucrose in Leibovitz L-15 supplemented with 10% decomplexed AB human serum. Ovarian tissue strips were finally transferred to a solution of Leibovitz L-15[®] supplemented with 20% of decomplexed AB human serum, for 10 more minutes.

Ovarian tissue dissociation

This technique, previously published by our team [51], was modified as described below. Cortical fragments were cut into small pieces of ~ 1 mm³ and placed in a cryovial containing the enzymatic solution. They underwent mechanical and enzymatic dissociation using either collagenase IA routinely used in our laboratory (200 IU/ml final, Sigma Aldrich), a GMP grade purified collagenase NB6 (200 IU/ml final, Serva Electrophoresis GmbH; Coger, France), or Liberase DH (0.28 Wünsch U/ml, Roche, France).

Fragments dissociated with collagenase IA or collagenase NB6 were incubated for 3 h in a heat chamber at 37 °C and vortexed every 30 min. The collagenase activity was inhibited by the addition of 30% decomplexed AB human serum. The ovarian cell suspension obtained was filtered through a 60 µm nylon filter (Fisher Scientific, France).

The protocol for tissue dissociation with Liberase DH was a modification of the protocol described by Vanacker et al. [43]. Fragments dissociated with Liberase DH were incubated for 90 min in a heat chamber at 37 °C with gentle agitation. The collagenase activity was inhibited by the addition of 30% decomplexed AB human serum.

Freezing/thawing of leukemic cells

Frozen/thawed blood or bone marrow (BM) cells originating from acute lymphoid leukemia (ALL) and acute

myeloid leukemia (AML) patients ($n = 8$), with known LAIP, were used for serial dilutions of leukemic cells in ovarian cell suspensions obtained from healthy ovarian cortical strips. Blood or bone marrow cells were collected at diagnosis, frozen and stored in liquid nitrogen. Leukemic cells were thawed at 37 °C for 5 min, then added dropwise to a solution containing 10 ml of RPMI 1640 GlutaMax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 20% fetal bovine serum (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). The solution was then incubated for 15 min at 37 °C and centrifugated at 300 g for 7 min. Finally, the pellet was resuspended in RPMI 1640 GlutaMax supplemented with 20% fetal bovine serum for cell counting.

Marking of leukemic cells using a cell tracer

Thawed leukemic cells were resuspended with 5 µM of CFDA SE Cell tracer (Vybrant[®] CFDA SE Cell Tracer Kit, Life Technologies SAS, France) as described by Soares et al., [42]. The CFDA SE Cell tracer allows for the labeling of leukemic cells in ovarian suspensions, with an inverted fluorescence microscope (CKX41, Olympus, France) by an intense green staining (ex/em: ~ 492/~ 517 nm). The observation of stained leukemic cells was performed punctually as a control of the isolation technique.

Addition of leukemic cells in an ovarian cell suspension

An initial addition of leukemic cells was made to obtain a first ovarian cell suspension with an excess of either 10⁶ or 10⁵ leukemic cells, depending on the total leukemic cells available after count. From this first suspension, 1/10 dilutions were made twice to obtain decreasing concentrations of leukemic cells in ovarian cell suspensions containing isolated follicles (we thus obtained three ovarian cell suspensions containing either 10⁶, 10⁵, and 10⁴ leukemic cells or 10⁵, 10⁴ and 10³ leukemic cells). The amount of leukemic cells added to ovarian suspensions was defined so as to achieve a sensitivity to an order of 10⁻⁵, which is comparable to the threshold of sensitivity for minimal residual disease detection by multicolor flow cytometry [17]. The remaining solution of leukemic cells was used as positive control of the experiment.

Follicle isolation and purification

The three resulting ovarian cell suspensions containing isolated follicles and leukemic cells were transferred to a Petri dish (IVF ICSI Nunc[™] dish, 35 × 10 mm, Thermo Scientific, France) containing 100 µl of in vitro fertilization medium (IVF[™], Vitrolife, France) under oil (Ovoil[™], Vitrolife, France). Isolated follicles were then manually picked up using a denudation pipette with an inner diameter of 130 µm (Vitrolife, France) and transferred to an IVF 4-well cell culture plate (Nunc[™], ThermoFisher Scientific, France), each well containing 30 µl of IVF medium under

oil. The denudation pipette was changed after each dilution group was transferred. Follicles were washed 3 times in fresh IVF medium droplets, as described by Soares et al., [42]. The remaining droplet from the first pipetting of follicles (no wash) in the first well and the last drop containing washed isolated follicles in the fourth well (after 3 washes) were analyzed by MFC. Isolated follicles were manually counted using the Fertimorph™ vision software on a micromanipulation station (Research Instruments, France) under bright field, with a Hoffman modulation contrast objective (Nikon, France).

Formation of a fibrin scaffold

The protocol used for the formation of a fibrin scaffold was a modification of the one previously described by Paulini et al. [53]. Evicel® is a fibrin sealant kit, routinely used in surgery and approved for clinical applications (Evicel®, Ethicon, France), which contains a solution of human fibrinogen (70 mg/ml) and a solution of human thrombin (1000 IU/ml). The stock solution of fibrinogen was diluted in alpha-minimum essential medium (α MEM, Sigma Aldrich, France) to obtain a final concentration of 50 mg/ml. Meanwhile, a stock solution of thrombin was also diluted in α MEM to obtain a final concentration of 10 IU/ml. A droplet of 15 μ l of fibrinogen was placed in a 4-well cell plastic culture plate in which 30 to 100 preantral follicles isolated with GMP grade collagenase NB6 were carefully placed. No prior filtration step was carried out on ovarian suspensions from which isolated follicles would be embedded in fibrin matrices. The droplet containing isolated follicles was then mixed with 15 μ l of thrombin solution. The resulting droplet of 30 μ l was finally incubated 45 min at 37 °C to allow the fibrin to polymerize.

In vitro culture of isolated follicles embedded in a fibrin scaffold

Fibrin scaffolds were submerged with ~ 200 μ l of culture medium made up of α MEM supplemented with 10% decomplexed AB human serum, 10 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml transferrin and 5 ng/ml sodium selenite (ITS supplement, Sigma Aldrich, France), and then incubated up to 3 days at 37 °C/5% CO₂. Half of the medium was changed the second day of culture with fresh pre-warmed supplemented culture medium.

Viability assessment

The initial health of isolated follicles was evaluated using trypan blue staining. Follicular suspensions were exposed to a 0.4% trypan blue solution (Sigma Aldrich, France) for 10 min. Dead follicles appeared in blue, and live ones were unstained after exposure to trypan blue staining [51].

Follicle viability was then assessed using a Live/Dead viability assay kit as described in the manufacturer's protocol (Live/Dead® viability assay kit for mammalian

cells, Life Technologies SAS, France). Briefly, isolated follicles were incubated in 30 μ l of phosphate-buffered saline 1X (PBS; Cambrex, Belgique) containing 4 mM calcein AM and 2 mM ethidium homodimer-1 for 30 min at room temperature in the dark. After exposure to fluorescent dyes, follicles were observed under an inverted fluorescence microscope (CKX41, Olympus, France). Green fluorescence was visualized in live cells (ex/em: ~494/~517 nm) and red fluorescence in dead cells (ex/em: ~528/~617 nm). Pictures were taken with a Moticom Pro 282S camera (Motic, Hong Kong).

Isolated follicles were classified in four categories depending on the percentage of dead granulosa cells: V1, living follicles: follicles with the oocyte and all the granulosa cells viable (stained green); V2, minimally damaged follicles: follicles with less than 10% of granulosa cells dead (stained red); V3, moderately damaged follicles: follicles with 10–50% of granulosa cells dead; V4, dead follicles: follicles with the oocyte or over 50% of granulosa cells dead [54].

Measurement of follicle diameter

Follicle diameters were calculated from measurements of isolated preantral follicles areas on images taken right after isolation and also after in vitro culture, using NIS software (NIS-Elements D 4.00.00, Nikon, France). Only follicles with the characteristic shape were considered. The basement membrane of follicles was taken as their outer limit. The follicle diameter was based on surface area measurement and computation of the theoretical diameter.

Immunocytochemistry

Fibrin scaffolds ($n = 4$) were fixed in formol 4% for 24 h, dehydrated and embedded in paraffin. They were then cut with a rotary microtome (HM 340E, Microm Microtech, France) into 7 μ m sections. Every five sections, slides were stained with hematoxylin-eosin (RAL Diagnostic, France) in order to confirm the presence of isolated follicles inside the gels. The proliferation of isolated human follicles seeded in fibrin clots was assessed by the presence of Ki67, which is localized in the nucleus and associated with cell proliferation. A rabbit anti-human Ki67 was used as the primary antibody (dilution 1/400, ref. RM-9106-S, ThermoFisher Scientific, France), and a mice anti-rabbit antibody from the same kit was used as a secondary antibody. Human fetal thymus obtained from our laboratory was used as a positive control, and the negative control consisted of buffer without primary antibody. The expression of Ki67 was characterized by a nuclear brown staining, and the slides were counterstained with anilin blue (ThermoFisher Scientific, France). Follicles were classified into two categories: non-growing follicles when all granulosa cells were Ki67-negative (blue coloration

only), and growing follicles when at least one granulosa cell was Ki67-positive (brown coloration) [55].

Multicolor flow cytometry (MFC) analysis

Markers of our experiments are routinely used in hematology for the diagnosis of leukemia. Eight-color MFC was performed using FACSCanto II™ flow cytometer and FACSDiva™ software version 6.1.3 (BD™ Biosciences, San Jose, CA, USA). The compensation matrix was set up using compbeads® (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The same combinations of eight monoclonal antibodies were applied to ovarian cell suspensions and to different leukemic cell dilutions in ovarian cell suspensions.

MFC gating strategy was based on previous studies from our team [15–17]. Briefly, our gating strategy was based on the elimination of debris using forward (FSC) and side (SSC) light scatter characteristics. Nucleated viable cells were selected by their SYTO13⁺/7-AAD⁻ phenotype. Within these cells, we identified the CD45_{low} population, which corresponds to ovarian and leukemic cells.

The antibody panel included fixed monoclonal antibodies: 7-AAD (Beckman Coulter, France) and SYTO13 (Invitrogen, France) to gate the living nucleated cells as described below and CD45 V500 (Horizon 500, HI30; BD Biosciences) and CD3 V450 (Horizon 450; UCHT1; BD Biosciences) to characterize T lymphocytes (CD45⁺/CD3⁺). The antibody panel also included variable monoclonal antibodies expressed on leukemic cells at diagnosis (LAIP) coupled: with phycoerythrin (PE), against the antigens CD33 (P67.6; BD Biosciences), or CD44 (515; BD Biosciences), or CD58 (AICD58; Beckman Coulter), or CD361 (MEM-216; Exbio); with allophycocyanin (APC), against CD10 (HI10A; Beckman Coulter), or CLEC 12A (50C1; BD Biosciences), or CD117 (104D2; BD Biosciences); with allophycocyanin H7 (APC-H7), against CD43 (1G10; BD Biosciences), or HLA DR (G46–6; BD Biosciences); with phycoerythrin-cyanin 7 (PC7), against CD19 (J3.119; Beckman Coulter), or CD34 (581; Beckman Coulter); with V450 and Brilliant Violet 421, against CD38 (HB7; BD Biosciences).

Antibodies were added to the cell suspension in 100 µl RPMI 1640 GlutaMax (Invitrogen, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) and incubated for 20 min at +4 °C. After being washed in PBS 1X, cells were resuspended in 100 µl of PBS 1X for MFC analysis.

A cell population was considered abnormal or positive when a homogeneous cluster of at least 20 events expressing the same LAIP as leukemic cells at diagnosis was detected [50]. When less than 20 events were detected by MFC, ovarian suspensions were considered negative or free of a significant number of malignant cells.

Statistical analysis

Graphpad™ software was used for all statistical analysis. Student's t test was used to compare the number of isolated follicles obtained after the dissociation with the GMP grade collagenase NB6, collagenase IA and Liberase DH. The Mann Whitney test was applied to compare the mean diameter of the follicles isolated from each enzyme used for ovarian tissue dissociation and to compare the mean diameter of isolated follicles after short-term in vitro culture. The comparison of the percentages of viable isolated follicles obtained with each enzyme was done using a chi-square test. Results were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Results

Evaluation of the GMP Collagenase NB6 for the isolation of human ovarian follicles

Follicle counting and classification

A total of 2674 follicles were isolated during our experiments ($n = 31$ cortical fragments). In order to validate our isolation technique, we first compared collagenase IA, which was previously used by our team, to collagenase NB6, which can be used in the clinic using the same concentration and incubation time. A total of 1361 (mean = 210 ± 205 for 100 mg of tissue; $n = 13$) follicles were isolated using the GMP grade collagenase NB6, and 1076 (mean = 127 ± 99 for 100 mg of tissue; $n = 13$) using collagenase IA. No significant difference was observed between the two enzymes concerning the number of follicles isolated ($p = 0.171$).

We then compared the follicles obtained after using collagenase NB6, collagenase IA and Liberase DH (Liberase DH has already been validated to isolate human follicles). A total of 532 (mean = 106 ± 97 for 100 mg of tissue; $n = 5$) follicles were isolated using the GMP grade collagenase NB6; 406 follicles (mean = 81 ± 68 for 100 mg of tissue; $n = 5$) were isolated with collagenase IA; and 327 follicles (mean = 65 ± 95 for 100 mg of tissue; $n = 5$) with Liberase DH. No significant differences were observed between the three enzymes concerning the number of follicles isolated ($p = 0.386$ for Liberase DH versus collagenase NB6; $p = 0.720$ for Liberase DH versus collagenase IA).

Isolated follicles were classified according to their stage for each isolation protocol. Most of the isolated follicles observed were primordial follicles no matter which enzyme was used: the rate of primordial follicles was 77.5% ($n = 247/319$) for collagenase IA, 83.7% ($n = 303/362$ isolated follicles) with collagenase NB6 and 75.1% ($n = 154/205$ isolated follicles) with Liberase DH. Isolation with Liberase DH yielded a higher rate of secondary follicles (10.3%; $n = 21/205$ isolated follicles) (Table 1).

The mean diameter of follicles was evaluated on 781 isolated follicles. Their average diameter was significantly lower when they were isolated with collagenase NB6 (mean

Table 1 Classification of isolated follicles per protocol after enzymatic dissociation of ovarian cortical strips

	Follicles (n)	Primordial (%)	Primary (%)	Secondary (%)
Collagenase IA (200 IU/ml)	319	247 (77.5)	55 (17.2)	17 (5.3)
Collagenase NB6 (200 IU/ml)	362	303 (83.7)	48 (13.3)	11 (3)
Liberase DH (0.28 Wünsch U/ml)	205	154 (75.1)	30 (14.6)	21 (10.3)

% = percentage of each follicular stage out of the total isolated follicles per protocol

= 31.66 ± 6.79 μm ; $n = 317$ follicles) when compared to collagenase IA (mean = 36.77 ± 7.69 μm ; $n = 273$ follicles) ($p < 0.0001$), and also in comparison with Liberase DH (mean = 45.21 ± 8.26 μm ; $n = 191$ follicles) ($p < 0.0001$).

Assessment of isolated follicle viability

Trypan blue staining was first used to assess the initial quality of isolated follicles. No significant differences were observed between trypan blue staining and the live/dead viability assay to determine the survival rate of isolated follicles ($p = 0.99$; $n = 76$ follicles analyzed).

After dissociation with collagenase NB6, 93.4% of the isolated follicles ($n = 254/272$ isolated follicles) were undamaged or minimally damaged (V1 + V2). The survival rate of follicles isolated with collagenase IA was 92.6% ($n = 276/298$ isolated follicles). After using Liberase DH, the percentage of viable isolated follicles was 94.9% ($n = 188/198$ isolated follicles) (Table 2).

There was no significant difference in terms of viability between the three isolation protocols ($p = 0.959$ for collagenase NB6 versus collagenase IA; $p = 0.877$ for collagenase NB6 versus Liberase DH; $p = 0.728$ for Liberase DH versus collagenase IA). However, more debris (stained in red by ethidium homodimer-1) were found when using collagenase IA (Fig. 1c and f).

In vitro culture of human ovarian follicles isolated with GMP grade collagenase NB6

Follicle proliferation before and after in vitro culture in a fibrin scaffold

The proliferative status of isolated preantral follicles was assessed after they were seeded inside a fibrin scaffold (Fig. 2). The mean rate of isolated follicles with Ki67-positive granulosa cells was $29 \pm 9.19\%$ ($n = 9/31$ follicles analyzed). Among the growing follicles, $23 \pm 1.43\%$ were small secondary follicles ($n = 7/12$ secondary follicles

Table 2 Viability of isolated follicles after dissociation of ovarian cortical strips

	Follicles (n)	V1	V2	V3	V4
Collagenase IA (200 IU/ml)	298	191	85	17	5
Collagenase NB6 (200 IU/ml)	272	194	60	14	4
Liberase DH (0.28 Wünsch U/ml)	198	145	43	10	0

Viability from V1 to V4, using collagenase IA ($n = 7$ patients), collagenase NB6 ($n = 6$ patients), and Liberase DH ($n = 5$ patients), according to the number of dead granulosa cells

analyzed), and $6 \pm 6.36\%$ represented primary follicles ($n = 2/13$ primary follicles analyzed). No primordial follicles were Ki67-positive ($n = 6$ primordial follicles).

After 3 days of in vitro culture, $45 \pm 1.41\%$ of isolated follicles were Ki67-positive, or growing follicles ($n = 10/22$ follicles analyzed). Among them, $36 \pm 2.83\%$ were secondary follicles ($n = 8/12$ secondary follicles analyzed), $9 \pm 1.41\%$ were primary follicles ($n = 2/6$ primary follicles analyzed) and none of them were primordial follicles. All primordial follicles were Ki67-negative ($n = 4$ primordial follicles) (Fig. 3).

Assessment of isolated follicle viability

After 3 days of in vitro culture, the recovery rate of isolated follicles was 69%. Indeed, a total of 456 follicles (range: 36–136 follicles) were embedded in fibrin matrices after their isolation with collagenase NB6, whereas 293 embedded follicles (range: 11–81 follicles) were found after 3 days of short-term in vitro culture. The viability was assessed on fibrin scaffolds containing isolated follicles after 3 days of in vitro culture: we found that 90.7% of the isolated follicles ($n = 307/339$ follicles) were undamaged (76% of V1) or minimally damaged (15% of V2) (Table 3).

In order to evaluate the follicular growth, all the follicles cultured were analyzed right after embedding them in fibrin gels and 3 days after their in vitro culture. At day 0, the mean diameter of follicles was 47.64 ± 5.99 μm ($n = 453$ follicles in 9 fibrin scaffolds). After 3 days of in vitro culture in a fibrin-based scaffold, the mean diameter of follicles significantly increased and was 55.64 ± 9.89 μm ($n = 263$ follicles in 9 fibrin scaffolds) ($p = 0.030$). At day 3, two significantly different populations of follicles were observed ($p < 0.0001$) (Fig. 4). Indeed, 37.6% (mean = 30.15 ± 5.02 μm ; 99/263 follicles) of the isolated follicles had a diameter less than or equal to 42 μm , whereas 62.4% (mean = 63.11 ± 18.78 μm ; 164/263 follicles) had a diameter greater than 42 μm (Fig. 4).

Modelization: addition of leukemic cells in human ovarian cell suspensions and isolation of preantral follicles

An excess of leukemic cells was added to the cell suspension obtained after dissociation of ovarian cortical strips by the GMP grade collagenase NB6. We chose to use collagenase NB6 in the following experiments, because its

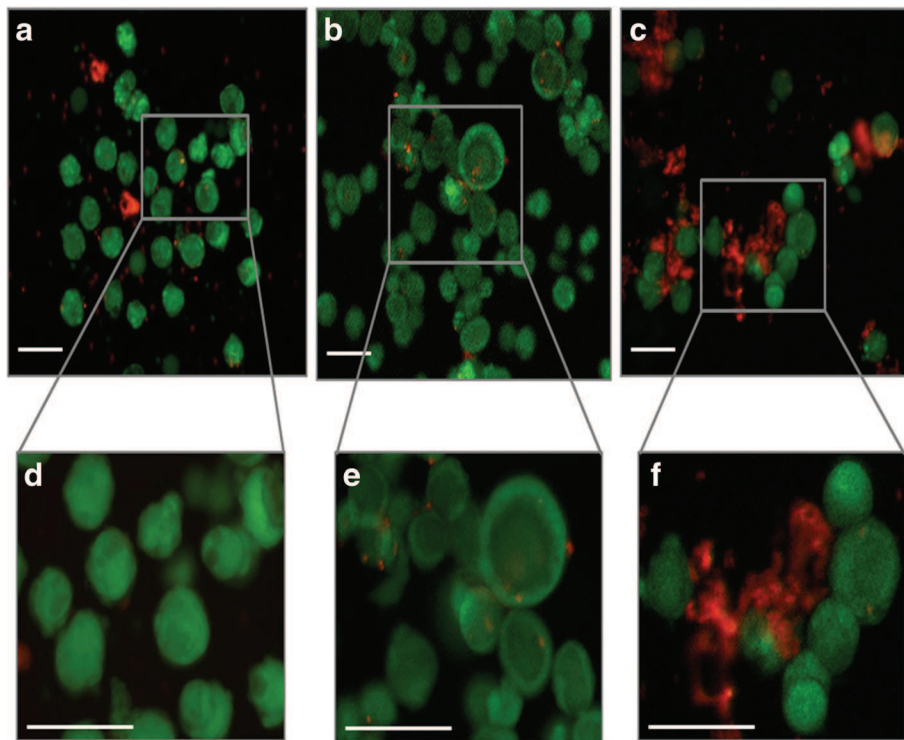


Fig. 1 Viability assay performed on isolated follicles using the fluorescent probes calcein AM and ethidium homodimer-1. **a** and **d**. Isolated follicles after using collagenase NB6; **b** and **e**. Isolated follicles after using Liberase DH; **c** and **f**. Isolated follicles after using collagenase IA; green: live follicles; red: dead follicles; scale bar = 100 μm

GMP grade makes it usable in the clinic and also because it generates less debris, as previously observed (Fig. 1). A total of 1068 follicles were picked up during leukemic cell addition in healthy ovarian cell suspensions (Fig. 5a-b). Leukemic cells may adhere to isolated follicles, but after three washes only rare leukemic cells were observed under

inverted microscope (Fig. 5c). Observation of ovarian follicular suspensions after 3 washes under an inverted fluorescence microscope confirmed that leukemic cells were mostly eliminated by the process (Fig. 5d-e).

The number of leukemic cells present in ovarian cell suspensions was evaluated by MFC. In the positive

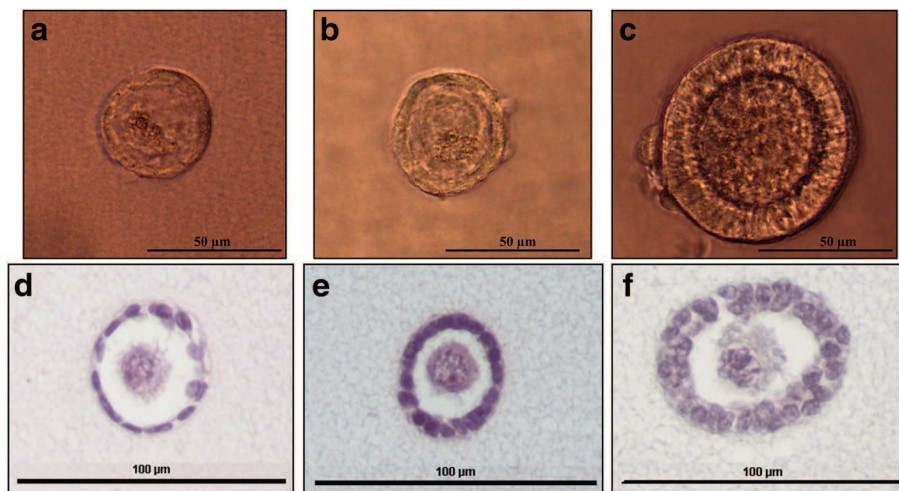


Fig. 2 Isolated preantral follicles embedded in a fibrin scaffold. Brightfield images of an isolated primordial (**a**), primary (**b**) and secondary (**c**) follicle inside a fibrin scaffold; Hematoxylin and eosin staining of an isolated primordial (**d**), primary (**e**) and secondary (**f**) follicle inside a fibrin scaffold

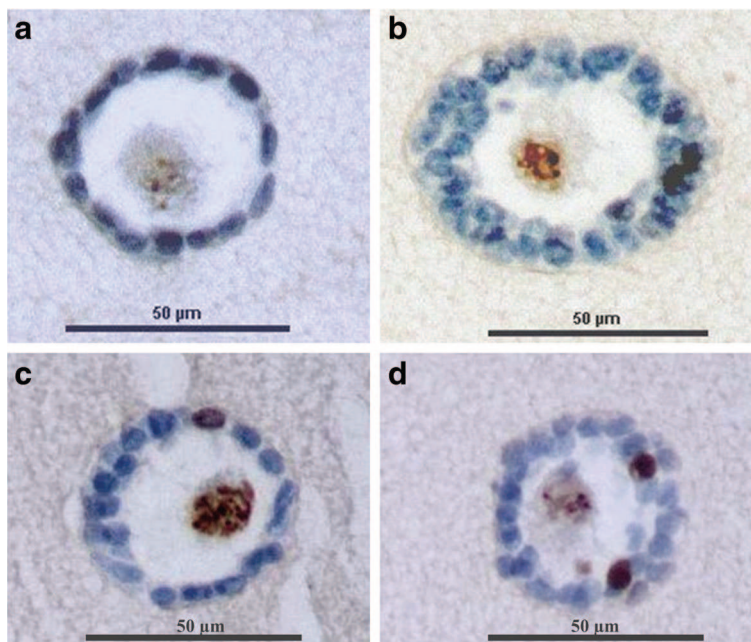


Fig. 3 Immunohistochemistry of isolated preantral follicles embedded in a fibrin scaffold. **a** Embedded isolated primordial follicle with Ki67-negative granulosa cells in blue; **b** Embedded isolated secondary follicle with Ki67-negative granulosa cells in blue; **c** Embedded isolated primary follicles with one Ki67-positive granulosa cell in brown; **d** Embedded isolated secondary follicles with two Ki67-positive granulosa cells in brown

control, the cluster of leukemic cells was homogeneous and easily detectable (Fig. 6a). After adding leukemic cells to the ovarian cell suspensions, the number of events detected was low after the first follicle pickup without wash (Fig. 6b), and drastically lower after three washes, even when adding 10^6 leukemic cells (Fig. 6c).

A total of 19,015 leukemic cells (mean = 792 ± 1402 leukemic cells; min = 1; max = 4889) were detected before any wash, whereas only 61 leukemic cells (mean = 3 ± 5 leukemic cells; min = 0; max = 22) were found

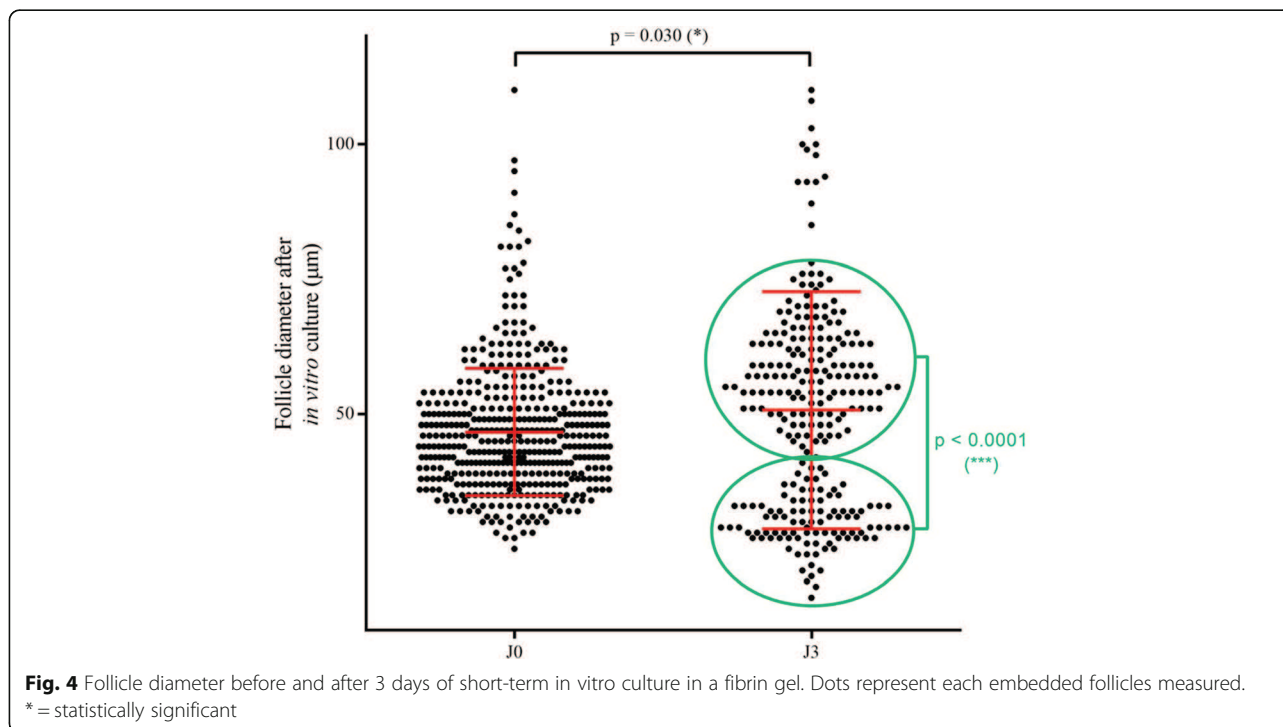
after 3 washes, no matter the dilution, across the 24 experiments ($n = 1068$ washed follicles).

Among the 24 experiments, only one cell suspension was positive after 3 washes in IVF medium with 22 events detected, and 23 ovarian cell suspensions were negative (Table 3). When 1 million leukemic cells were added to ovarian cell suspensions, a mean of 2042 ± 1885 events corresponding to leukemic cells were detected before any wash (min = 7; max = 4889; $n = 8$ cell suspensions analyzed), whereas only a mean of 5 ± 7 events were detected after 3 washes (min = 0; max = 22; $n = 8$ cell suspensions analyzed). For 10^5 leukemic cells added, we found a mean of 316 ± 420 events corresponding to leukemic cells before any wash (min = 1; max = 1265; $n = 8$ cell suspensions analyzed) and a mean of 2 ± 2 events after 3 washes (min = 0; max = 4; $n = 8$ cell suspensions analyzed). Finally, for the lowest concentration of leukemic cells (10^4), a mean of 19 ± 15 events was detected before any wash (min = 1; max = 37; $n = 8$ cell suspensions analyzed) compared to a mean of 1 ± 1 events after 3 washes (min = 0; max = 2; $n = 8$ cell suspensions analyzed) (Table 4).

In order to see the impact of follicle pickup and washes on follicle survival, we evaluated the viability of 323 isolated follicles after three washes according to the classification V1 to V4, using the calcein AM/ethidium homodimer-1 viability assay. The viability of isolated follicles after undergoing three washes was 97.2% ($n = 314/323$) (Table 5).

Table 3 Viability of isolated follicles in fibrin scaffolds after 3 days of in vitro culture

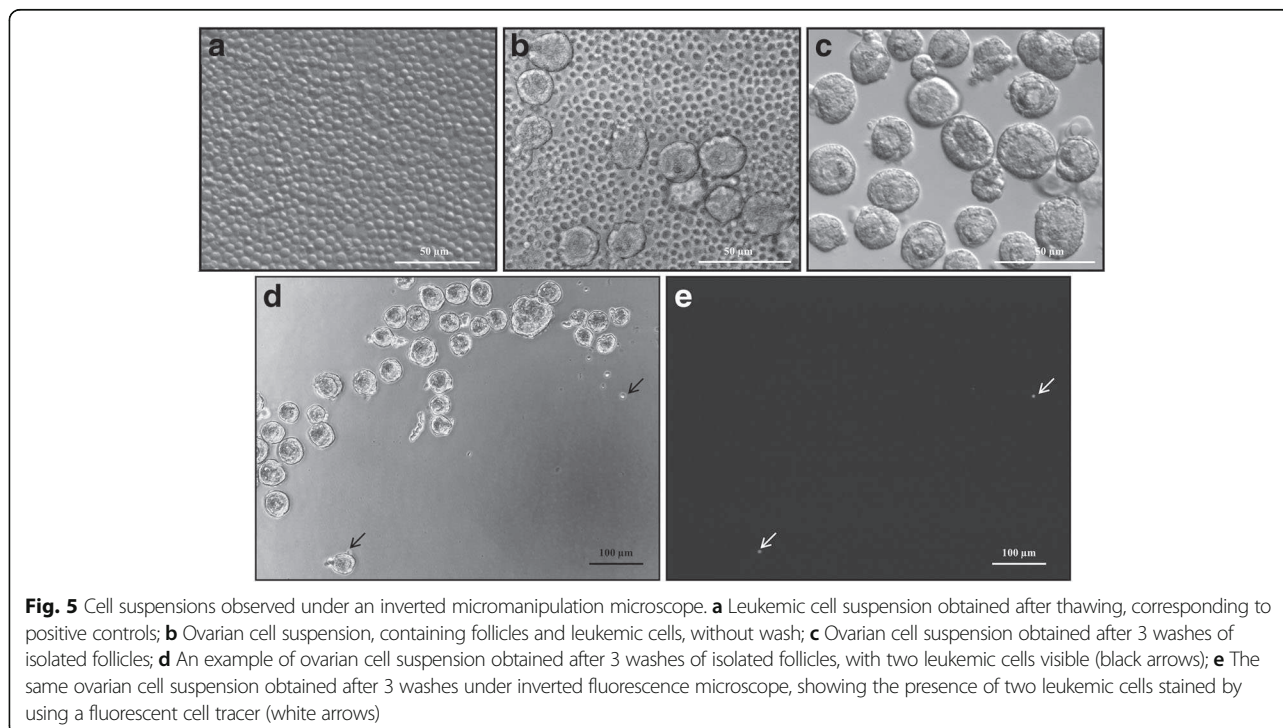
J3				
Number of fibrin gels ($n = 9$)	V1	V2	V3	V4
1	10	1	0	0
2	35	5	2	1
3	25	7	5	2
4	24	5	3	2
5	18	11	3	1
6	46	8	2	0
7	38	7	1	0
8	33	2	2	1
9	27	5	7	0
Total	256	51	25	7

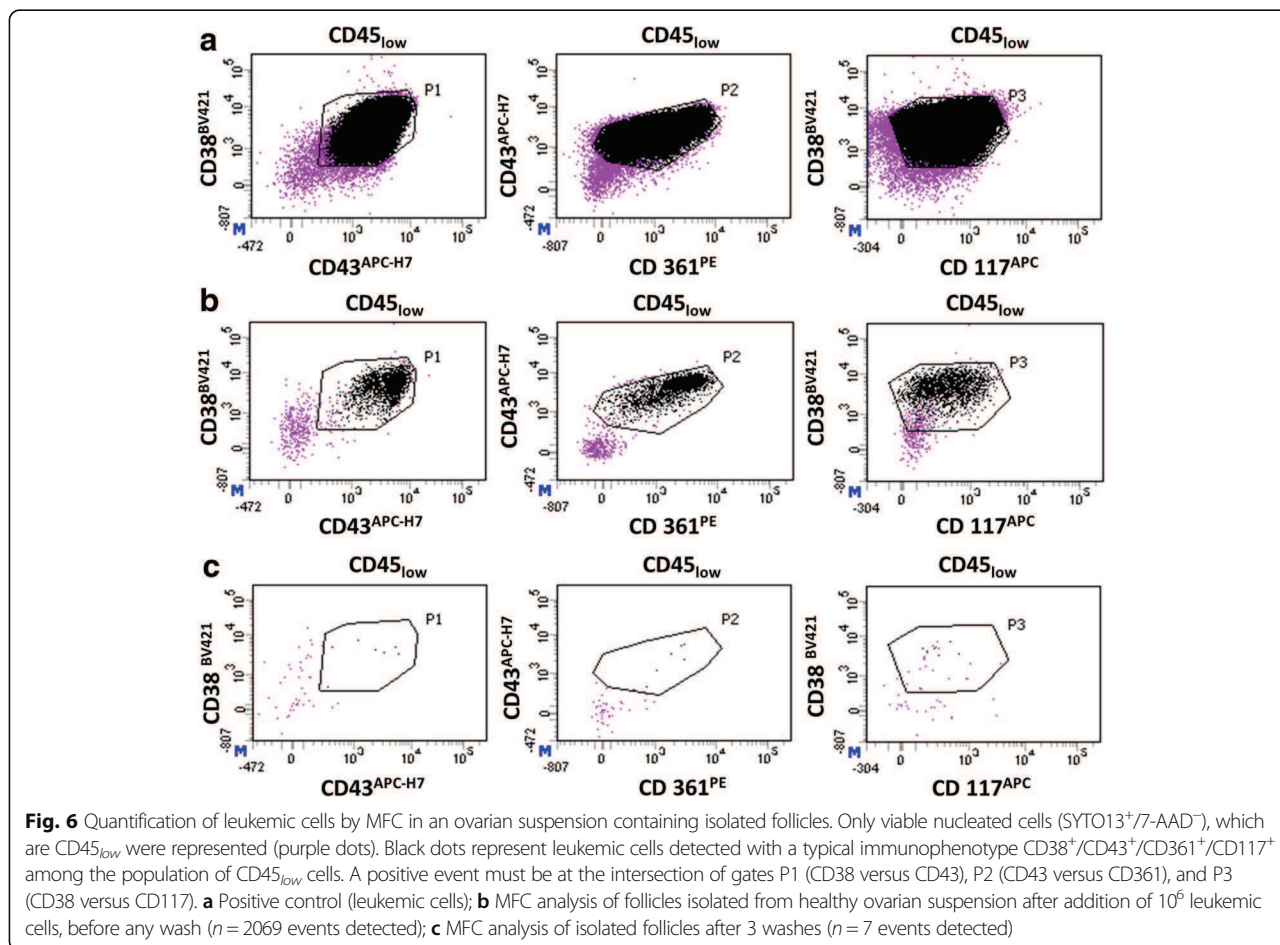


Discussion

The lifespan of women suffering from cancer continues to increase thanks to the curative treatments currently available. However, it is also well-known that cancer treatments are often associated with decreased quality of life, for instance sexual dysfunction [56, 57] and psychosocial

disease [58, 59], such as anxiety and depression [60]. Side effects following the administration of therapies may vary according to the type of disease, the type and duration of the treatment, the age of patients and their socio-economic situation. When the administration of highly gonadotoxic treatments is necessary, techniques such as





oocyte-, embryo- and ovarian tissue cryopreservation are currently available [7]. For some pathologies including endometrial cancer and ovarian cancer, conservative surgery treatments can also be recommended as fertility sparing strategies [61, 62]. It is important to point out that appropriate fertility preservation counseling is primordial in order to offer adequate fertility preservation techniques and to help women overcome this hardship, but is also mandatory in some countries such as France [63]. Fertility preservation counseling is even more important when ovarian tissue transplantation is associated with a high risk of cancer reseeding, and women should be aware when the autograft of their cryopreserved ovarian tissue would be too dangerous.

When the risk of reseeding malignant cells via the ovarian graft is too high, the transplantation of isolated preantral follicles may be one of the best feasible alternatives. Protocols used for the isolation of preantral follicles can have an impact on their survival, function and morphological integrity [46, 64]. Our study is the first to validate the efficiency of the purified GMP grade collagenase NB6 to successfully isolate a significant number of viable human ovarian follicles.

No significant differences were found between Liberase DH, collagenase IA and the GMP grade collagenase NB6 in terms of yield. However, ovarian suspensions obtained after using GMP grade collagenase NB6 and Liberase DH were less contaminated with undesirable components such as dead cell fragments and conjunctive debris. These components, still present if the digestion is not complete, can stick to isolated follicles, tending to make the follicle isolation process longer and more difficult. The possibility that some follicles observed under the stereomicroscope were actually created by their association with debris and thus creating a heap of extracellular matrix components cannot be excluded in this case.

The mean diameter of follicles isolated with collagenase NB6 was close to results obtained in a study comparing Liberase DH and collagenase IA [43]. Diameters of isolated follicles in our study were significantly lower with collagenases IA and NB6 in comparison to Liberase DH. This might be explained by the additional filtration step used in our procedure to collect follicles of less than 60 μm after the dissociation, contrary to the protocol used for Liberase DH.

Table 4 Results obtained after analysis by MFC of the isolated follicle suspensions after adding leukemic cells

Patients	Cortical biopsy weight (mg)	Number of isolated follicles	Number of added leukemic cells	Type of leukemia	MFC		Results	
					Before wash	After 3 washes	Before wash	After 3 washes
1	46.2	93	1.10 ⁶	B-ALL	4889	0	POSITIVE	NEGATIVE
1	46.2	89	1.10 ⁵	B-ALL	452	4	POSITIVE	NEGATIVE
1	46.2	91	1.10 ⁴	B-ALL	32	0	POSITIVE	NEGATIVE
2	69.6	4	1.10 ⁶	B-ALL	7	0	NEGATIVE	NEGATIVE
2	69.6	10	1.10 ⁵	B-ALL	6	0	NEGATIVE	NEGATIVE
2	69.6	17	1.10 ⁴	B-ALL	1	0	NEGATIVE	NEGATIVE
3	77	50	1.10 ⁵	AML	15	3	NEGATIVE	NEGATIVE
3	77	35	1.10 ⁴	AML	1	0	NEGATIVE	NEGATIVE
3	77	31	1.10 ³	AML	3	0	NEGATIVE	NEGATIVE
4	70.9	11	1.10 ⁶	AML	177	4	POSITIVE	NEGATIVE
4	70.9	5	1.10 ⁵	AML	11	1	NEGATIVE	NEGATIVE
4	70.9	3	1.10 ⁴	AML	3	0	NEGATIVE	NEGATIVE
5	31.7	47	1.10 ⁶	AML	3434	22	POSITIVE	POSITIVE
5	31.7	46	1.10 ⁵	AML	388	3	POSITIVE	NEGATIVE
5	31.7	36	1.10 ⁴	AML	37	2	POSITIVE	NEGATIVE
6	59.3	88	1.10 ⁶	AML	3799	6	POSITIVE	NEGATIVE
6	59.3	96	1.10 ⁵	AML	1265	3	POSITIVE	NEGATIVE
6	59.3	65	1.10 ⁴	AML	36	1	POSITIVE	NEGATIVE
7	38.6	12	1.10 ⁶	AML	2069	7	POSITIVE	NEGATIVE
7	38.6	20	1.10 ⁵	AML	206	2	POSITIVE	NEGATIVE
7	38.6	16	1.10 ⁴	AML	25	2	POSITIVE	NEGATIVE
8	38.6	63	1.10 ⁶	AML	1942	1	POSITIVE	NEGATIVE
8	38.6	68	1.10 ⁵	AML	202	0	POSITIVE	NEGATIVE
8	38.6	72	1.10 ⁴	AML	15	0	NEGATIVE	NEGATIVE
Total		1068			19,015	61		
Mean					792	3		
Standard deviation					1402	5		
Number of experiments	24							

Results obtained before and after three washes of 24 ovarian suspensions containing isolated follicles, in which serial dilutions of leukemic cells (from 10³ to 10⁶) were artificially added

Table 5 Viability of isolated follicles after three washes

Number of experiments	V1	V2	V3	V4
1	21	10	2	0
2	16	7	3	0
3	20	15	0	0
4	60	8	3	0
5	52	5	1	0
6	92	8	0	0
Total	261	53	9	0

n = 6 ovarian strips

The survival rate of isolated follicles was very high in all cases after the dissociation technique, which is in agreement with other studies aiming to isolate human preantral follicles [42, 43, 46, 65].

Ki67 analysis showed that the majority of isolated follicles analyzed after using collagenase NB6 contained Ki67-negative granulosa cells. Even after 3 days of in vitro culture, less than 50% of follicles were non-growing. This shows that most of the isolated follicles were not activated following dissociation with the GMP grade collagenase NB6. Growing follicles (Ki67-positive) were mostly secondary follicles, probably due to their initial development before the dissociation step. The GMP grade collagenase

NB6 should not activate the growth of preantral follicles and therefore does not alter their initial condition before their transplantation in leukemia patients.

Indeed we did not observe a high growth of human isolated follicles as seen in other studies performed for 7 days [53, 66, 67], but the time required to initiate their growth must be longer to allow them to fully benefit from the nutrients present in their culture environment. After only 3 days of *in vitro* culture, we started to observe a heterogeneous distribution of isolated follicles, reflecting the presence of two distinct populations.

According to our results concerning the proliferation of cultured follicles, we can hypothesize that the population of isolated follicles with a diameter below 42 μm must be non-growing follicles still quiescent in the fibrin matrix; whereas the second population with a higher diameter may correspond to activated follicles that have started their development. A longer culture duration of 7 days or more should be done to check this hypothesis and see if more growing follicles (Ki67-positive) would be found.

Small isolated follicles, mostly primordial and primary follicles obtained after dissociation of thawed human ovarian cortical pieces are fragile, so they can rapidly deteriorate in culture even if a large number are viable soon after their isolation [64]. After 3 days of *in vitro* culture, isolated follicles succeeded in maintaining a high viability, of more than 90%, supporting the idea that the use of GMP grade collagenase NB6 is safe for the isolation of human ovarian preantral follicles.

The fibrin formulation previously used by Paulini et al. [53] was sufficient to produce a scaffold able to support and maintain the 3D structure of human follicles up to 3 days *in vitro*. However, after this period, we observed a degradation of the matrix around some follicles and a loss of follicles (data not shown). It has already been described in the literature that fibrin clots tend to shrink and degrade after *in vitro* culture due to fibrinolysis induced by the production of plasminogen activators and connective tissue growth factors by granulosa cells [68–70]. To inhibit this process, other components like aprotinin have been added to the culture media [71]. However, the aim of our study was not to perform an *in vitro* folliculogenesis but to evaluate the effect of a new GMP grade collagenase on human isolated follicles. This is why we did not extend the culture longer than 3 days, especially as this period was sufficient to evaluate the harmlessness of the GMP grade collagenase NB6.

For clinical purposes, in cases of cancer where the risk of malignant cell contamination is high, it is now clear that new protocols aiming at “isolating human ovarian follicles should include an additional step to confirm the absence of malignant cells in the follicular suspension”

as suggested by Amorim and Shikanov [72]. After the validation of our isolation technique, we wanted to ensure the safety of the procedure by adding frozen/thawed malignant cells obtained from AML and ALL patients in healthy ovarian cell suspensions. The possibility of purging the entire ovarian suspensions using a fluorescent labelling system with antibodies specific to malignant cells has been investigated [73]. However, even though it is efficient, this method can be time-consuming and for now these devices cannot be sterilized for re-use in clinics. Soares et al. have demonstrated the safety of their isolation process after the dissociation of artificially contaminated human ovarian tissue from healthy women [42] and from leukemia patients [74], by using RT-qPCR and fluorescence microscopy to detect the presence of leukemic cells in ovarian suspensions. Contrary to their study, we used the technique of MFC, which we have previously codified, as a detection technique to assess the number of living leukemic cells present in ovarian suspensions obtained after the dissociation of human cryopreserved cortical strips [17].

Even though the theoretical number of leukemic cells potentially present in a fragment has been estimated based on biopsy volume and average volume density of blood vessels in the ovarian cortex [42, 75], we cannot accurately state how many cancer cells would be present in cryopreserved ovarian tissue from leukemia patients. To ensure that we were able to eliminate leukemic cells in any case, we decided to add an excess of 10^3 to 10^6 leukemic cells in healthy ovarian suspensions containing isolated follicles. The quantity of malignant cells present in ovarian tissue from leukemia patients would most likely be lower than the number of leukemic cells added in the present study, especially as leukemia patients are likely to have already initiated chemotherapy before cryopreservation [11, 17, 76]. However, even though chemotherapy can decrease the presence of leukemic cells, it has been shown that it cannot completely eliminate the risk of contamination [12, 15, 49].

During the isolation procedure, before any wash, it can be difficult to distinguish leukemic cells from stromal cells. Indeed, as observed by Soares et al., the size of leukemic cells is close to that of stromal cells [42]. Moreover, the diameter of the denudation pipette used for all experiments was large enough to allow the aspiration of debris and leukemic cells during the follicle pickup.

In most of our experiments, the number of leukemic cells present in the ovarian cell suspensions after three washes would not be sufficient to potentially induce a relapse of the disease, as according to the literature, the level of minimal residual disease in blood and bone marrow is considered positive when more than 20 positive events are detected by MFC [50]. In only one

case in our study, the number of leukemic cells detected was higher than 20 events after three washes. This case corresponded to a suspension in which 1 million leukemic cells were added; knowing that such a high amount of malignant cells would likely not be found in cryopreserved ovarian biopsies from leukemia survivors, these results are quite promising. The viability of isolated follicles was not altered by washes, thereby confirming the harmlessness of the isolation technique.

The major advantage of the MFC strategy is to quantify leukemic cells specifically by differentiating them from ovarian cells and normal lymphocytes that could be present in the ovarian cortex. Nevertheless, it is possible that a few leukemic cells could be undetected by MFC if they are aggregated to isolated follicles. Three washes of the isolated follicles into droplets of fresh *in vitro* fertilization medium were able to reduce the amount of leukemic cells that could potentially contaminate the ovarian suspension. These results also confirmed the efficiency of MFC to detect leukemic cells among a suspension containing washed human isolated follicles. We would like to insist on the fact that, when molecular markers are not available, MFC is the only technique applicable to quantifying the risk of ovarian residual disease, and so it should be offered to all patients with a risk of leukemia reseeding in the future.

Conclusion

As a conclusion, we succeeded in codifying a new isolation protocol that allows us to obtain a high number of viable follicles from human ovarian cortex using the highly-purified blend enzyme collagenase NB6 produced in accordance with good manufacturing practices. Indeed, the primordial follicles were maintained in their basement statement. In the majority of cases, three washes of the isolated follicles were sufficient to ensure the subsequent carcinologic safety of the final ovarian suspension. This GMP clinical-grade enzyme, in combination with the present isolation technique, will enable the use of isolated human preantral follicles for future clinical applications.

Abbreviations

ALL: Acute lymphoblastic leukemia; AML: Acute myeloid leukemia; BM: Bone marrow; DMSO: Dimethyl sulfoxide; FSC: Forward light scatter; GMP: Good manufacturing practices; ICSI: Intra cytoplasmic sperm injection; ITS: Insulin, transferring, sodium, selenite; IVF: *In vitro* fertilization; LAIP: Leukemia-associated immunophenotype; MFC: Multicolor flow cytometry; MRD: Minimal residual disease; PBS: Phosphate-buffered saline; RPMI: Roswell park memorial institute; RT-qPCR: Real time quantitative polymerase chain reaction; SSC: Side light scatter; α MEM: alpha-Minimum essential medium

Acknowledgements

The authors thank Aurélie BERDIN, MD (Service de Gynécologie-Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon) for her help in the ovarian tissue collection, Professor Séverine VALMARY DEGANO (Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon) for the performance of paraffin

blocks and immunocytochemical analyses and Jason SELLERS, medical intern (Bryn Mawr Hospital, Philadelphia) for the language revision.

Funding

This study was supported by the BioMedicine Agency (Agence de la Biomedecine, 2015 call for tender: assisted reproductive technology, prenatal diagnosis and genetic diagnosis), the Committee of the League against Cancer (Comité de la ligue contre le Cancer, Haut-Rhin, 2011), Besançon University Hospital (APICHU call for tender, Franche-Comté Regional council, 2011) and the DGOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche translationnelle 2012). Funding for a doctoral thesis has been awarded by the regional Council of Franche-Comté (Conseil Régional de Franche-Comté, 2014).

Availability of data and materials

All data generated and analyzed during this study are included in the published article.

Authors' contributions

EM Study design, experimental procedures, interpretation of results and manuscript preparation. TZ Experimental procedures, statistical analyses and manuscript revision. CR Study design, interpretation of results and manuscript revision. CA Study design, experimental procedures, interpretation of results and manuscript revision. All authors approved the final manuscript.

Ethical approval and consent to participate

The use of human ovarian tissue was approved by the clinical ethics committee of Besançon University Hospital in 2013; all patients gave their informed consent. The use of leukemic cells from leukemia patients was approved by the department of research and innovation (CRB F.Cabanne, Dijon-Besançon, France; biological collection authorization n°DC-2008-713). The use of AB human serum from male donors was approved by the French blood establishment (request of blood samples for non-therapeutic uses, BFC/PSL/COL/FO/014).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹University Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France. ²INSERM CIC-1431, University Hospital of Besançon, Clinical Investigation Center in Biotherapy, F-25000 Besançon, France. ³Department of Reproductive Medicine and Biology, Cryobiology, University Hospital of Besançon, 3 boulevard Fleming, 25000 Besançon Cedex, France.

Received: 24 August 2017 Accepted: 26 December 2017

Published online: 05 January 2018

References

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9–29.
2. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(2):83–103.
3. Imbert R, Moffa F, Tsepelidis S, Simon P, Delbaere A, Devreker F, et al. Safety and usefulness of cryopreservation of ovarian tissue to preserve fertility: a 12-year retrospective analysis. *Hum Reprod.* 2014;29(9):1931–40.
4. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2917–31.
5. Peddie VL, Porter MA, Barbour R, Culligan D, MacDonald G, King D, et al. Factors affecting decision making about fertility preservation after cancer diagnosis: a qualitative study. *BJOG.* 2012;119(9):1049–57.

6. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(12):735–49.
7. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *N Engl J Med*. 2017;377(17):1657–65.
8. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(3):325–36.
9. Bastings L, Beerendonk CC, Westphal JR, Massuger LF, Kaal SE, van Leeuwen FE, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2013;19(5):483–506.
10. Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril*. 2013;99(6):1514–22.
11. Dolmans MM, Marinescu C, Saussoy P, Van Langendonck A, Amorim C, Donnez J. Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood*. 2010;116(16):2908–14.
12. Greve T, Schmidt KT, Kristensen SG, Ernst E, Andersen CY. Evaluation of the ovarian reserve in women transplanted with frozen and thawed ovarian cortical tissue. *Fertil Steril*. 2012;97(6):1394–8. e1
13. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53(4):727–39.
14. Jahnukainen K, Tinkanen H, Wikstrom A, Dunkel L, Saarinen-Pihkala UM, Makinen S, et al. Bone marrow remission status predicts leukemia contamination in ovarian biopsies collected for fertility preservation. *Leukemia*. 2013;27(5):1183–5.
15. Zver T, Alvergnas-Vieille M, Garnache-Ottou F, Roux C, Amiot C. A new method for evaluating the risk of transferring leukemic cells with transplanted cryopreserved ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(8):1263–6.
16. Zver T, Alvergnas-Vieille M, Garnache-Ottou F, Ferrand C, Roux C, Amiot C. Minimal residual disease detection in cryopreserved ovarian tissue by multicolor flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014;99(12):e249–52.
17. Amiot C, Angelot-Delettre F, Zver T, Alvergnas-Vieille M, Saas P, Garnache-Ottou F, et al. Minimal residual disease detection of leukemic cells in ovarian cortex by eight-color flow cytometry. *Hum Reprod*. 2013;28(8):2157–67.
18. Zver T, Mouloungui E, Berdin A, Roux C, Amiot C. Validation of an automated technique for ovarian cortex dissociation: isolation of viable ovarian cells and their qualification by multicolor flow cytometry. *J Ovarian Res*. 2017;10(1):38.
19. Soares M, Saussoy P, Sahrari K, Amorim CA, Donnez J, Dolmans MM. Is transplantation of a few leukemic cells inside an artificial ovary able to induce leukemia in an experimental model? *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(4):597–606.
20. Chiti MC, Dolmans MM, Orellana R, Soares M, Paulini F, Donnez J, et al. Influence of follicle stage on artificial ovary outcome using fibrin as a matrix. *Hum Reprod*. 2016;31(2):427–35.
21. Laronda MM, Jakus AE, Whelan KA, Wertheim JA, Shah RN, Woodruff TK. Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant. *Biomaterials*. 2015;50:20–9.
22. Laronda MM, Duncan FE, Hornick JE, Xu M, Pahnke JE, Whelan KA, et al. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(8):1013–28.
23. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Scalercio SR, Donnez J, Amorim CA. First step in developing a 3D biodegradable fibrin scaffold for an artificial ovary. *J Ovarian Res*. 2013;6(1):83.
24. Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Legat C, Fortuno Moya C, Donnez J, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertil Steril*. 2014;101(4):1149–56.
25. Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM, Des Rieux A, Jaeger J, Van Langendonck A, et al. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials*. 2012;33(26):6079–85.
26. Kniazeva E, Hardy AN, Boukaidi SA, Woodruff TK, Jeruss JS, Shea LD. Primordial follicle transplantation within designer biomaterial grafts produce live births in a mouse infertility model. *Sci Rep*. 2015;5:17709.
27. Laronda MM, Rutz AL, Xiao S, Whelan KA, Duncan FE, Roth EW, et al. A bioprosthetic ovary created using 3D printed microporous scaffolds restores ovarian function in sterilized mice. *Nat Commun*. 2017;8:15261.
28. Vanacker J, Amorim CA. Alginate: a versatile biomaterial to encapsulate isolated ovarian follicles. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(7):1633–49.
29. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Molskness TA, Ting AY, Stouffer RL, et al. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. *Hum Reprod*. 2013;28(8):2187–200.
30. Xu J, Xu M, Bernuci MP, Fisher TE, Shea LD, Woodruff TK, et al. Primate follicular development and oocyte maturation in vitro. *Adv Exp Med Biol*. 2013;761:43–67.
31. Camboni A, Van Langendonck A, Donnez J, Vanacker J, Dolmans MM, Amorim CA. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology*. 2013;67(1):64–9.
32. Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Hum Reprod*. 2012;27(6):1801–10.
33. Barrett SL, Shea LD, Woodruff TK. Noninvasive index of cryorecovery and growth potential for human follicles in vitro. *Biol Reprod*. 2010;82(6):1180–9.
34. Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 2002;123(2):185–202.
35. Xu J, Bernuci MP, Lawson MS, Yeoman RR, Fisher TE, Zelinski MB, et al. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction*. 2010;140(5):685–97.
36. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, Kondapalli LA, Kiesewetter SE, Shea LD, et al. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod*. 2009;24(10):2531–40.
37. Abir R, Roizman P, Fisch B, Nitke S, Okon E, Orvieto R, et al. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. *Hum Reprod*. 1999;14(5):1299–301.
38. Abir R, Fisch B, Nitke S, Okon E, Raz A, Ben RZ. Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertil Steril*. 2001;75(1):141–6.
39. Yin H, Jiang H, Kristensen SG, Andersen CY. Vitrification of in vitro matured oocytes collected from surplus ovarian medulla tissue resulting from fertility preservation of ovarian cortex tissue. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(6):741–6.
40. Heeren AM, van Iperen L, Klootwijk DB, de Melo BA, Roost MS, Gomes Fernandes MM, et al. Development of the follicular basement membrane during human gametogenesis and early folliculogenesis. *BMC Dev Biol*. 2015;15:4.
41. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction*. 2003;126(4):415–24.
42. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, Saussoy P, Donnez J, Dolmans MM. Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. *Fertil Steril*. 2015;104(3):672–80. e2
43. Vanacker J, Camboni A, Dath C, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J, et al. Enzymatic isolation of human primordial and primary ovarian follicles with Liberase DH: protocol for application in a clinical setting. *Fertil Steril*. 2011;96(2):379–83. e3
44. Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Nottola SA, et al. Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Hum Reprod*. 2006;21(2):413–20.
45. Chiti MC, Dolmans MM, Hobeika M, Cernogoraz A, Donnez J, Amorim CA. A modified and tailored human follicle isolation procedure improves follicle recovery and survival. *J Ovarian Res*. 2017;10(1):71.
46. Lierman S, Tillemans K, Cornelissen M, De Vos WH, Weyers S, T'Sjoen G, et al. Follicles of various maturation stages react differently to enzymatic isolation: a comparison of different isolation protocols. *Reprod BioMed Online*. 2015;30(2):181–90.
47. Brandhorst H, Friberg A, Nilsson B, Andersson HH, Felldin M, Foss A, et al. Large-scale comparison of Liberase HI and collagenase NB1 utilized for human islet isolation. *Cell Transplant*. 2010;19(1):3–8.
48. Fazzina R, Mariotti A, Procoli A, Fioravanti D, Ludicone P, Scambia G, et al. A new standardized clinical-grade protocol for banking human umbilical cord tissue cells. *Transfusion*. 2015;55(12):2864–73.

49. Soares M, Saussoy P, Maskens M, Reul H, Amorim CA, Donnez J, et al. Eliminating malignant cells from cryopreserved ovarian tissue is possible in leukaemia patients. *Br J Haematol*. 2017;178(2):231–9.
50. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*. 1999;38(4):139–52.
51. Fauque P, Ben Amor A, Joanne C, Agnani G, Bresson JL, Roux C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertil Steril*. 2007;87(5):1200–7.
52. Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrlrich PS, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil Steril*. 2010; 93(7):2413. e15–9.
53. Paulini F, Vilela JM, Chiti MC, Donnez J, Jadoul P, Dolmans MM, et al. Survival and growth of human preantral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicle isolation and short-term xenografting. *Reprod BioMed Online*. 2016;33(3):425–32.
54. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, Defrere S, Donnez J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertil Steril*. 2004;82(5):1390–4.
55. Dolmans MM, Yuan WY, Camboni A, Torre A, Van Langendonck A, Martinez-Madrid B, et al. Development of antral follicles after xenografting of isolated small human preantral follicles. *Reprod BioMed Online*. 2008;16(5):705–11.
56. Vitale SG, La Rosa VL, Rapisarda AM, Lagana AS. Comment on: "the consequences of gynaecological cancer in patients and their partners from the sexual and psychological perspective". *Prz Menopauzalny*. 2016;15(3):186–7.
57. Lagana AS, La Rosa VL, Fanale D, Vitale SG. Comment on: survey of cervical cancer survivors regarding quality of life and sexual function. *J Cancer Res Ther*. 2017;13(3):598–9.
58. Vitale SG, La Rosa VL, Rapisarda AMC, Lagana AS. Fertility preservation in women with gynaecologic cancer: the impact on quality of life and psychological well-being. *Hum Fertil (Camb)*. 2017;1–4. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1339365>.
59. Lagana AS, La Rosa VL, Rapisarda AM, Platania A, Vitale SG. Psychological impact of fertility preservation techniques in women with gynaecological cancer. *Ecancermedicalscience*. 2017;11:ed62.
60. Vitale SG, La Rosa VL, Rapisarda AM, Lagana AS. Comment on: "anxiety and depression in patients with advanced ovarian cancer: a prospective study". *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2017;38(1):83–4.
61. Vitale SG, Rossetti D, Tropea A, Biondi A, Lagana AS. Fertility sparing surgery for stage IA type I and G2 endometrial cancer in reproductive-aged patients: evidence-based approach and future perspectives. *Updat Surg*. 2017;69(1):29–34.
62. Chiofalo B, Palmara V, Lagana AS, Triolo O, Vitale SG, Conway F, et al. Fertility sparing strategies in patients affected by placental site Trophoblastic tumor. *Curr Treat Options in Oncol*. 2017;18(10):58.
63. Vitale SG, La Rosa VL, Rapisarda AMC, Lagana AS. The importance of fertility preservation counseling in patients with gynecologic cancer. *J Reprod Infertil*. 2017;18(2):261–3.
64. Lenie S, Cortvrindt R, Adriaenssens T, Smits J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. *Biol Reprod*. 2004;71(5):1730–8.
65. Soares M, Sahrari K, Chiti MC, Amorim CA, Ambrose J, Donnez J, et al. The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: medulla or cortex, cryopreserved or fresh? *Hum Reprod*. 2015;30(7):1589–98.
66. Vanacker J, Luyckx V, Amorim C, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, et al. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? *Fertil Steril*. 2013;99(5):1363–8. e2.
67. Amorim CA, Van Langendonck A, David A, Dolmans MM, Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod*. 2009;24(1):92–9.
68. Thorne JT, Segal TR, Chang S, Jorge S, Segars JH, Leppert PC. Dynamic reciprocity between cells and their microenvironment in reproduction. *Biol Reprod*. 2015;92(1):25.
69. Shikanov A, Zhang Z, Xu M, Smith RM, Rajan A, Woodruff TK, et al. Fibrin encapsulation and vascular endothelial growth factor delivery promotes ovarian graft survival in mice. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(23–24):3095–104.
70. Chiti MC, Dolmans MM, Donnez J, Amorim CA. Fibrin in reproductive tissue engineering: a review on its application as a biomaterial for fertility preservation. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(7):1650–63.
71. Shikanov A, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials*. 2009; 30(29):5476–85.
72. Amorim CA, Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. *Future Oncol*. 2016;12(20):2323–32.
73. Schroder CP, Timmer-Bosscha H, Wijchman JG, de Leij LF, Hollema H, Heineman MJ, et al. An in vitro model for purging of tumour cells from ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2004;19(5):1069–75.
74. Soares M, Saussoy P, Maskens M, Reul H, Amorim CA, Donnez J, et al. Eliminating malignant cells from cryopreserved ovarian tissue is possible in leukaemia patients. *Br J Haematol*. 2017. <https://doi.org/10.1111/bjh.14657>.
75. Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Gomez R, Gaytan F. Superficial ovarian cortex vascularization is inversely related to the follicle reserve in normal cycling ovaries and is increased in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(5):1142–51.
76. Abir R, Ben-Aharon I, Garor R, Yaniv I, Ash S, Stemmer SM, et al. Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy. *Hum Reprod*. 2016;31(4):750–62.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access



Validation of an automated technique for ovarian cortex dissociation: isolation of viable ovarian cells and their qualification by multicolor flow cytometry

Tristan Zver^{1,3*}, Elodie Mouloungui^{1,2,3}, Aurélie Berdin⁴, Christophe Roux^{1,2,3} and Clotilde Amiot^{1,2,3}

Abstract

Background: Ovarian tissue cryopreservation is a technique for fertility preservation addressed to prepubertal girls or to patients for whom no ovarian stimulation is possible before initiation of gonadotoxic treatments. Autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue is the only available option for reuse but presents some limitations: ischemic tissue damages post-transplant and reintroduction of malignant cells in cases of cancer. It is therefore essential to qualify ovarian tissue before autograft on a functional and oncological point of view. Here, we aimed to isolate viable cells from human ovarian cortex in order to obtain an ovarian cell suspension analyzable by multicolor flow cytometry.

Methods: Ovarian tissue (fresh or frozen-thawed), from patients with polycystic ovarian syndrome (reference tissue) and from patients who underwent ovarian tissue cryopreservation, was used for dissociation with an automated device. Ovarian tissue-dissociated cells were analyzed by multicolor flow cytometry; the cell dissociation yield and viability were assessed. Two automated dissociation protocols (named laboratory and commercial protocols) were compared.

Results: The effectiveness of the dissociation was not significantly different between reference ovarian tissue ($1.58 \times 10^6 \pm 0.94 \times 10^6$ viable ovarian cells per 100 mg of ovarian cortex, $n = 60$) and tissue from ovarian tissue cryopreservation ($1.70 \times 10^6 \pm 1.35 \times 10^6$ viable ovarian cells, $n = 18$). However, the viability was slightly different for fresh ovarian cortex compared to frozen-thawed ovarian cortex whether we used reference tissue ($p = 0.022$) or tissue from ovarian cryopreservation ($p = 0.018$). Comparing laboratory and commercial protocols, it appeared that cell yield was similar but cell viability was significantly improved when using the commercial protocol ($81.3\% \pm 12.3\%$ vs $23.9\% \pm 12.5\%$).

Conclusion: Both dissociation protocols allow us to isolate more than one million viable cells per 100 mg of ovarian cortex, but the viability is higher when using the commercial dissociation kit. Ovarian cortex dissociation is a promising tool for human ovarian cell qualification and for ovarian residual disease detection by multicolor flow cytometry.

Keywords: Fertility preservation, Ovarian tissue, Tissue dissociation, Cell qualification, Multicolor flow cytometry

* Correspondence: t1zver@chu-besancon.fr

¹Centre Hospitalier Régional Universitaire Jean Minjoz, Service de Biologie et Médecine de la Reproduction - Cryobiologie, CECOS Franche-Comté Bourgogne, CIC-1431, 3 boulevard Fleming, F-25030 Besançon Cedex, France

³Université de Franche-Comté, 1 rue Goudimel, F-25030 Besançon Cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Although cancer remains one of the most important causes of mortality, therapeutic advances have allowed a huge increase of the survival during these last years. In Europe, overall survival at 5 years reaches 78.3% and 71.9% for girls (0-15) and women (15-44) diagnosed between 2000 and 2007 respectively [1, 2]. Unfortunately, some chemotherapy and/or radiotherapy regimens are highly gonadotoxic and could induce premature ovarian failure.

Women with cancer have several options to preserve their fertility: ovarian transposition (only in cases of pelvic irradiation), embryo or oocyte cryopreservation and ovarian tissue cryopreservation (OTC) [3, 4] (which can be combined with immature oocytes collection [5, 6]). Currently, embryo and oocyte cryopreservation are the only established methods endorsed by the American Society of Reproductive Medicine (ASRM) [7], the American Society of Clinical Oncology (ASCO) [8] and the European Society for Medical Oncology (ESMO) [9]. Ovarian cortex cryopreservation is recognized in France as one fertility preservation option (law of Bioethics n°2004–800) and has several advantages as no ovarian stimulation is required and it can be proposed to prepubertal girls or patients in whom gonadotoxic treatment cannot be postponed [10].

Ovarian tissue reuse is still considered experimental, while some authors suggest that autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue should now be considered as established procedure for female fertility preservation [11–13]. Indeed, transplantation of frozen-thawed ovarian tissue has already resulted in 86 reported live births worldwide [14, 15] and, in a recent study including 111 women, the proportion of women who conceived after autograft of cryopreserved ovarian tissue was 29% [11]. Nevertheless, this technique presents some limitations: especially ischemic tissue damages after ovarian tissue transplantation, which lead to follicular loss [16–19]; and the risk of reintroducing malignant cells in cases of malignancies that may metastasize to the ovary.

Some studies have shown that malignant cells could be identified in ovarian tissue by using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), human ovarian tissue xenografts into immunodeficient mice [20–22] or multicolor flow cytometry (MFC) as demonstrated previously by our team [23–25]. MFC allowed us to differentiate and quantify viable leukemic cells among viable human ovarian cells. It is therefore important to obtain an ovarian cell suspension after ovarian tissue dissociation that can be analyzed by MFC.

The aim of the current study is to validate an automated dissociation technique, combining mechanical and enzymatic effects, in order to obtain ovarian cortex tissue-dissociated cells, especially somatic cells such as stromal extravascular cells and endothelial cells. We

used two different sources of human ovarian tissue: reference tissue collected during ovarian drilling and tissue from patients who underwent OTC. The ovarian suspension was analyzed by MFC to identify viable ovarian cells and to determine the cell viability rate after ovarian tissue dissociation. Finally, we compared our dissociation method (named laboratory protocol) with a commercial dissociation kit in order to try and improve ovarian tissue dissociation.

Methods

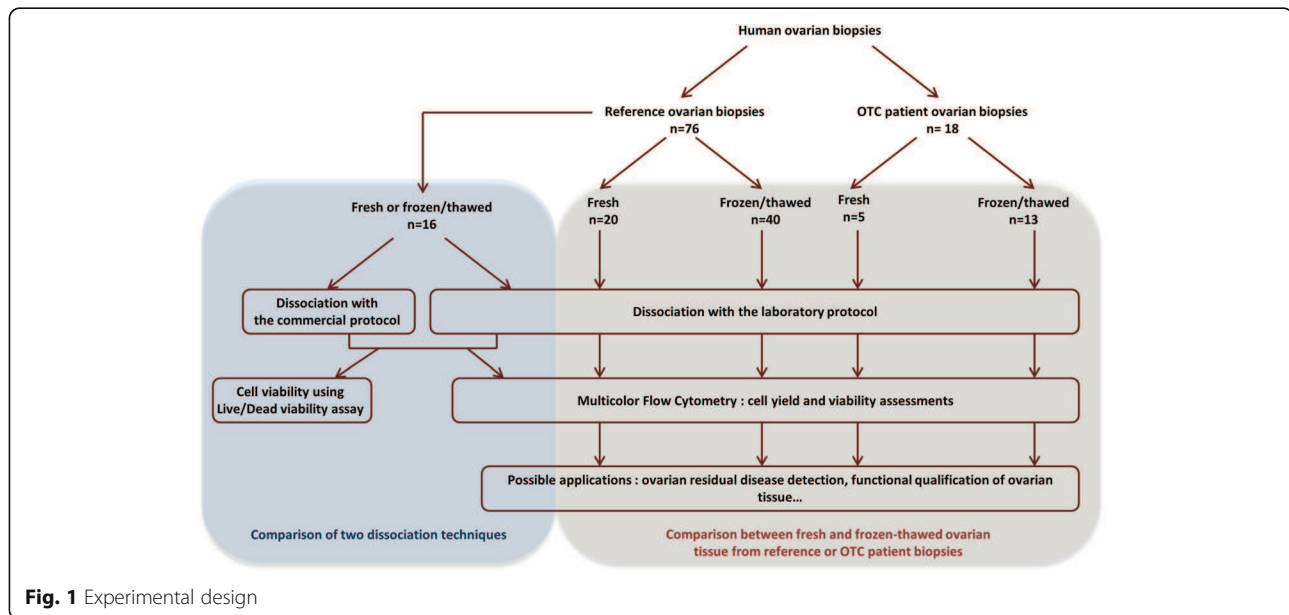
Ovarian tissue samples

The experimental design of the study is shown in Fig. 1. Reference ovarian tissue samples, commonly used in the laboratory, from women undergoing laparoscopic drilling for polycystic ovary syndrome (PCOS, 23-38 years of age, $n = 76$) and ovarian cortical tissue from patients in whom OTC was performed for different pathologies (6-33 years of age, $n = 18$: acute leukemia $n = 13$, Ewing's sarcoma $n = 2$, Hodgkin's lymphoma $n = 2$, and systemic lupus erythematosus $n = 1$), were used to validate the ovarian tissue dissociation method. All patients received chemotherapy before OTC.

Freezing-thawing and isolation procedure for ovarian tissue

Cortical biopsies were used, either fresh ($n = 25$) or after cryopreservation ($n = 53$), according to a protocol using slow cooling with manual seeding [26]. After freezing, the vials were stored in liquid nitrogen. Ovarian cortical biopsies were thawed according to the technique previously described [27].

Fragments used for this study were weighed ($106.4 \text{ mg} \pm 63.4$ [range = 20.9-276.4], $n = 60$ for reference ovarian tissue; $180.8 \text{ mg} \pm 228.8$ [range = 54.0-1070.0], $n = 18$ for ovarian tissue from OTC) to determine the cell dissociation yield and then compare cell yield between each ovarian tissue sample. Pieces of ovarian cortex, either fresh or frozen-thawed, underwent a mechanical and enzymatic dissociation using an automated cell dissociator (gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) after being sectioned into pieces of $\approx 1\text{-}2 \text{ mm}^3$ [23]. The isolation procedure for ovarian cells developed in our laboratory is based on enzymatic dissociation by collagenase Ia (100 mg/mL; Sigma; Saint-Quentin Fallavier, France) and DNase I (0.1 mg/mL; Roche Diagnosis, Meylan, France) in 5 mL of RPMI (PAA laboratories, Les Mureaux, France) using C Tubes (Miltenyi Biotec SAS) for 40 min at 37 °C under gentle agitation. After ovarian tissue dissociation, we performed filtration with a 70 μm cell strainer (Dutscher SAS, Brumath, France) to eliminate the residual connective tissue fibres and washed with 5 mL of RPMI. The cell suspension was centrifuged at



300 g for 7 min at 4 °C and the pellet was resuspended in an appropriate volume of RPMI.

We also tested a commercial dissociation kit using the same automated cell dissociator (Tumor Dissociation Kit, human ref. 130-095-929, Miltenyi Biotec), but differing from the laboratory protocol regarding the enzymes used (3 different enzymes called H, R and A) and the time of incubation at 37 °C (one hour). We compared the quality of ovarian tissue dissociation between both isolation procedures.

In a previous article, we demonstrated that the freezing-thawing process as well as the enzymatic procedure carried out in our laboratory protocol had no effect on the expression of cell surface markers used in this study [23]. The test performed by the manufacturer for the commercial kit are in accordance with these findings.

Ovarian cell suspension analysis by multicolor flow cytometry

MFC was performed using a BD CANTO II flow cytometer and FACSDiva software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Instrument settings were in accordance with standardized Euroflow protocols [28]. The compensation matrix was set up as previously described [23]. The antibody panel included 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), SYTO 13 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), CD45 coupled with Horizon V500 (V500) (HI30, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and CD3 coupled with Horizon V450 (V450) (UCHT1, BD Biosciences). At least 10,000 total events were acquired for the analysis. Gating strategy (Fig. 2) was based on the elimination of debris by an initial morphological gate using forward (FSC) and side (SSC) light scatter

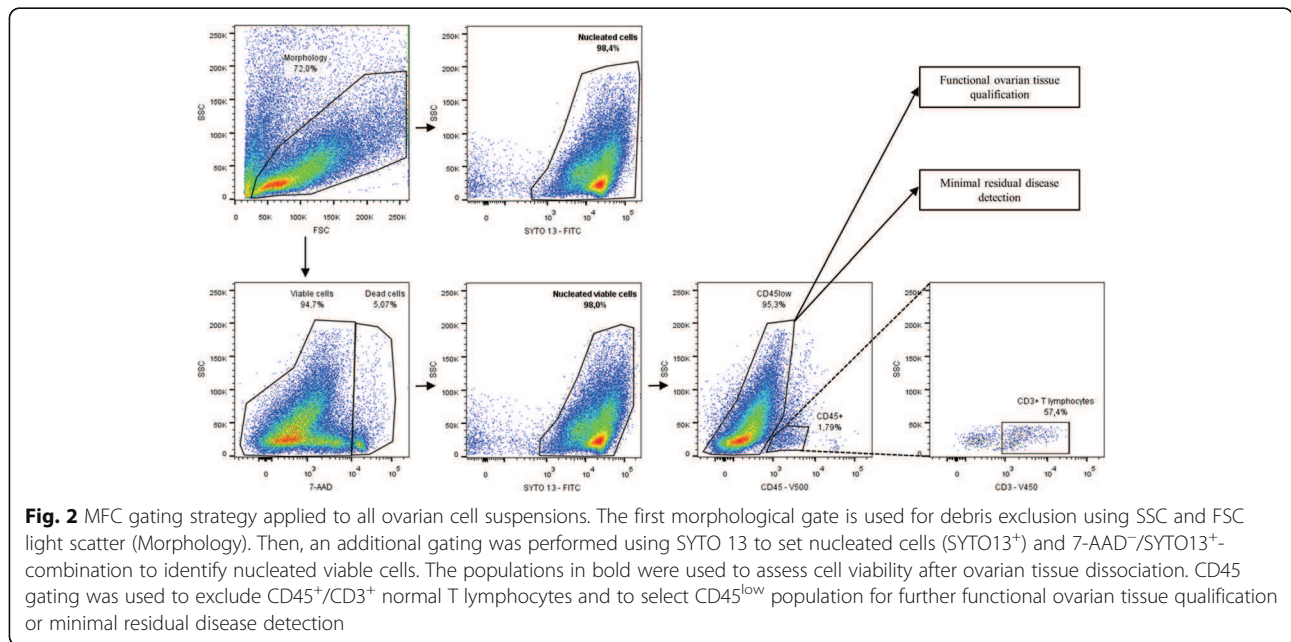
characteristics. Nucleated viable cells were then selected by their SYTO 13⁺/7-AAD⁻ phenotype. Within these cells, we identified CD45⁺ and CD3⁺ T lymphocytes. Cell yield is given as the number of viable ovarian cells per 100 mg of dissociated tissue, Flowcount™ Fluorospheres (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) being used for absolute count. Viability is equal to the ratio between the number of viable nucleated events and the number of nucleated events (Fig. 2).

Observation of ovarian cell suspension viability by fluorescence microscopy

Cell viability was assessed by using Live/Dead assay kit as described in the manufacturer's protocol (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, Molecular Probes™, Life Technologies SAS, Eugene, USA). Briefly, ovarian cells were incubated in 10 mL PBS containing 4 mM Calcein AM and 2 mM Ethidium homodimer-1 (EthD-1) for 30 min at 25 °C in the dark. After exposure to fluorescent dyes, ovarian cells were observed under an inverted fluorescence microscope (CKX41, Olympus France SA) equipped with a CCD Color Peltier Cooled camera (MotiCam Pro 282B, MotiC, Hong Kong). Viable isolated ovarian cells are stained with Calcein AM which emits green fluorescence (517 nm) when excited by blue light (494 nm); whereas dead cells are stained by EthD-1, which emits red fluorescence (617 nm) when excited by green light (528 nm).

Statistical analysis

Using the Mann-Whitney test, we compared cell yield and viability from reference ovarian tissue and patient



ovarian samples, both fresh and frozen-thawed. A Wilcoxon match-pairs signed rank test was used to compare cell yield and viability results between the two different dissociation protocols. Results were plotted using GraphPad software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant for all tests.

Results

Assessment by multicolor flow cytometry of isolated viable cells obtained from ovarian cortex

The ovarian cell suspension obtained after ovarian cortex dissociation was analyzed by MFC to quantify viable nucleated cells (SYTO 13⁺/7-AAD⁻) and to determine the cell yield of the dissociation technique (results extrapolated to 100 mg of ovarian tissue).

Table 1 shows the results of the cell yield and viability obtained by MFC after dissociation of reference ovarian tissue or tissue from OTC.

Cell yield and viability comparison between reference ovarian tissue and patient samples from OTC by multicolor flow cytometry

No statistically significant difference was observed for cell yield between reference ovarian tissue (1.58×10^6 viable cells per 100 mg of tissue $\pm 1.22 \times 10^6$, *n* = 60) and tissue from OTC (1.70×10^6 viable cells per 100 mg of tissue $\pm 1.65 \times 10^6$, *n* = 18) (*p* = 0.781, Fig. 3a). Then we analyzed results either with fresh or frozen-thawed ovarian tissue. For both types of ovarian tissue, there is no difference in cell yield depending on whether we used fresh (*p* = 0.148) or frozen-thawed (*p* = 0.299) ovarian tissue (Fig. 3a).

No significant difference was also observed for cell viability between the two types of ovarian tissue after dissociation: 31% for reference ovarian tissue (*n* = 60) and 24% for OTC tissue (*n* = 18) (*p* = 0.088) (Fig. 3a). However, looking specifically at fresh and frozen-thawed tissues, we saw no difference for fresh ovarian tissue (*p* = 0.755) and a slight difference between frozen-thawed

Table 1 Cell yield and viability obtained by multicolor flow cytometry analysis after dissociation of reference ovarian tissue and tissue for ovarian tissue cryopreservation

Parameters	Yield (living ovarian cells/100 mg of tissue)				Viability (percentage)			
	Reference ovarian tissue		Tissue from OTC		Reference ovarian tissue		Tissue from OTC	
Tissue origin	Fresh	Frozen-thawed	Fresh	Frozen-thawed	Fresh	Frozen-thawed	Fresh	Frozen-thawed
n	20	40	5	13	20	40	5	13
Mean	1.56×10^6	1.59×10^6	3.31×10^6	1.09×10^6	38.2	27.0	42.4	16.9
Standard deviation	0.94×10^6	1.35×10^6	2.41×10^6	0.64×10^6	18.2	15.4	21.4	14.3
Minimum	0.34×10^6	0.20×10^6	0.25×10^6	0.81×10^5	9.0	2.0	17.0	1.0
Maximum	4.28×10^6	6.85×10^6	6.22×10^6	2.33×10^6	73.0	67.0	67.0	51.0

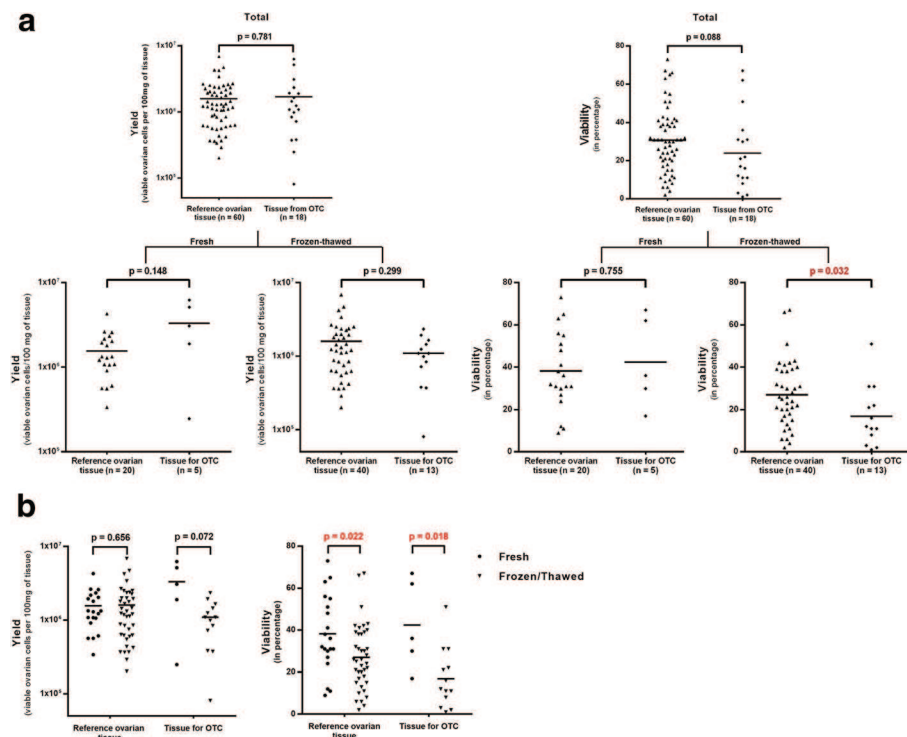


Fig. 3 Assessment of cell yield and viability by multicolor flow cytometry after ovarian tissue dissociation. **a** Comparison between reference ovarian tissue and tissue from patients undergoing ovarian tissue cryopreservation in terms of yield and viability. **b** Comparison between fresh and frozen-thawed ovarian tissue in terms of yield and viability. The mean value for each data set is represented by a horizontal bar. Significant *p*-values are indicated in red. OTC - ovarian tissue cryopreservation

reference ovarian tissue and frozen-thawed tissue from OTC ($p = 0.032$) (Fig. 3a).

Cell yield and viability comparison between fresh and frozen-thawed ovarian tissue by multicolor flow cytometry

Cell yield and viability results were also analyzed regarding the potential impact of cryopreservation on reference ovarian tissue or tissue from OTC.

There was no significant difference in cell yield whether the tissue was fresh or frozen-thawed (reference tissue: $p = 0.656$; tissue for OTC: $p = 0.072$). However, there was a significant difference in cell viability between fresh and frozen-thawed tissue (reference tissue: $p = 0.022$; tissue for OTC: $p = 0.018$). Indeed, ovarian cell viability is increased when the tissue is fresh rather than frozen-thawed (Fig. 3b).

Comparison between laboratory and commercial dissociation methods

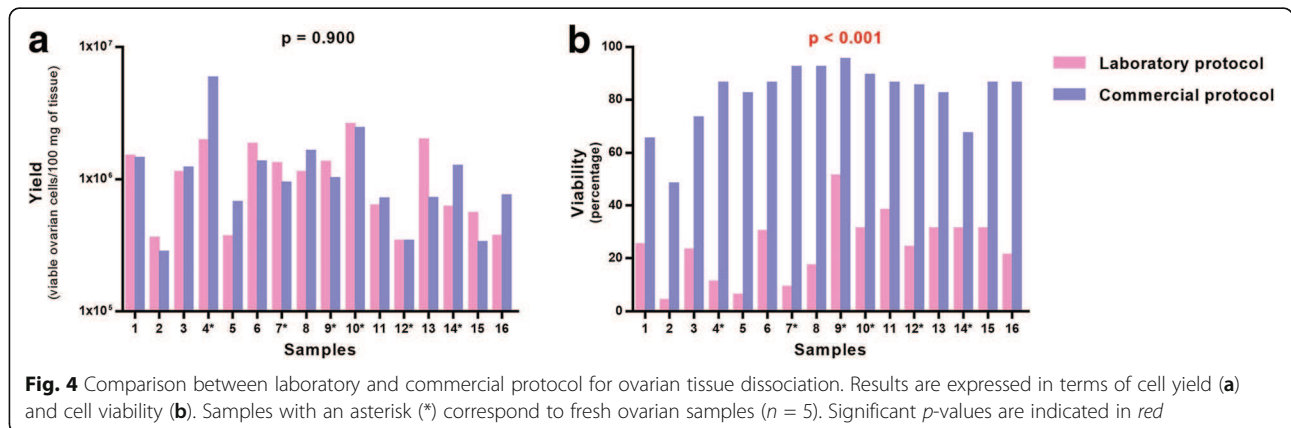
Using MFC analysis, we compared ovarian cell yield and viability obtained after fresh or frozen-thawed reference ovarian tissue dissociation (16 different samples) performed with our laboratory protocol or with the commercial protocol (Fig. 4).

The cell yield was not significantly different between the laboratory protocol ($1.18 \times 10^6 \pm 0.71 \times 10^6$ viable nucleated cells per 100 mg of reference ovarian tissue [range = 0.34×10^6 - 2.59×10^6], $n = 16$) and the commercial protocol ($1.29 \times 10^6 \pm 1.31 \times 10^6$ [range = 0.28×10^6 - 5.76×10^6], $n = 16$) (Fig. 4a). On the contrary, a significant decrease in viability was observed ($p < 0.0001$) with the laboratory protocol ($23.9 \pm 12.5\%$ [range = 4-51], $n = 16$) in comparison to commercial protocol ($81.3 \pm 12.3\%$ [range = 48-95], $n = 16$) (Fig. 4b).

Light microscope observation of ovarian cell suspensions revealed less debris when using the commercial protocol (Fig. 5a and b). Fluorescence microscopy showed a higher number of dead cells (in red) when using the laboratory dissociation protocol (Fig. 5c and d).

Discussion

In this study, an original technique to isolate viable cells from human ovarian cortex was validated. Previous dissociation methods have been described in the literature: they've been used to isolate follicles from ovarian cortex [29–32] or discarded medulla tissue from women undergoing fertility preservation [33, 34]. The current study does not aspire to isolate ovarian follicles, but it aims to

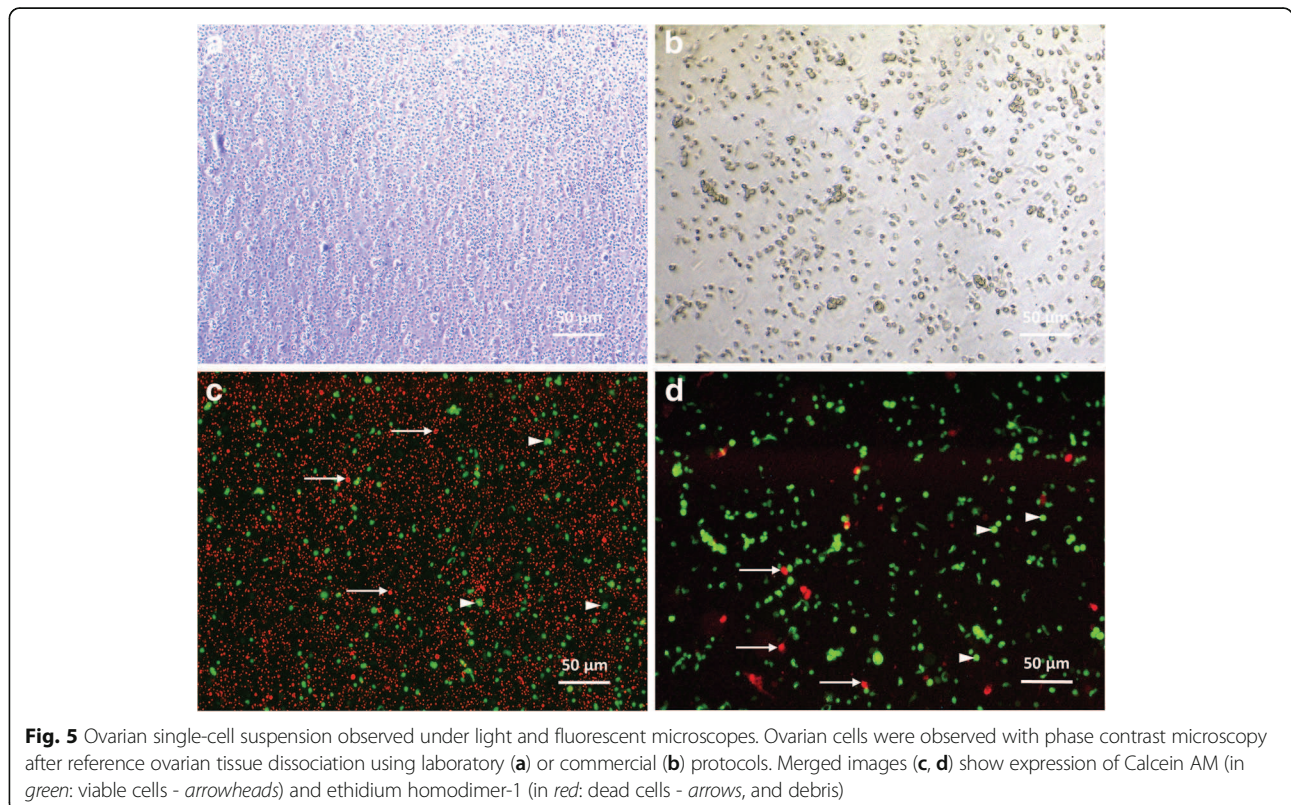


get an analyzable ovarian cell suspension for subsequent analysis by MFC.

Laboratory and commercial protocols used mechanical and enzymatic dissociation which allowed us to get a cell suspension analyzable by MFC. Although the laboratory dissociation protocol was previously tested by our team [23], we demonstrated here that the average viable ovarian cell yield obtained after ovarian tissue dissociation was higher than one million per 100 mg of tissue with both protocols. It can also suggest that an amount of 100 mg of ovarian tissue is sufficient to detect ovarian residual disease by MFC with a sensitivity of 10^{-4} [24, 25]. No difference

was observed in terms of cell yield between reference ovarian tissue and tissue from OTC. This result demonstrates that our model of reference ovarian tissue obtained from women with PCOS is close to ovarian tissue from OTC.

Comparison between fresh and frozen-thawed ovarian tissue is important to demonstrate whether freezing-thawing procedure had an impact or not on cell yield and viability. The results obtained in this study have shown no difference in cell yield between fresh or frozen-thawed ovarian tissue. On the other hand, freezing leads to a slight decrease in viability after ovarian tissue thawing



and dissociation. These results hold for reference ovarian tissue and cortex from OTC. Previous reports have suggested that slow freezing could have a negative impact on ovarian cells [35, 36]. Similar results were observed in our study, with decreased cell viability but no impact of slow freezing on cell yield as seen in Soares et al. [36]. This might be explained by the ovarian heterogeneity between different biopsies and patient samples. However, these findings are in agreement with the fact that the use of fresh or frozen-thawed ovarian tissue from the same patient should not change the results obtained after dissociation, which is very useful as ovarian minimal residual disease detection is most often performed on cryopreserved ovarian tissue.

All patients who underwent OTC had received chemotherapy before fertility preservation. Our results of ovarian tissue dissociation showed no difference in cell yield and viability between reference tissue and tissue for OTC. Therefore, chemotherapy seems to have no impact or a limited impact on the amount and viability of ovarian tissue-dissociated cells. This result is particularly interesting for ovarian residual disease detection as leukemia patients could have received chemotherapy prior to OTC: we won't need a large number of ovarian cortical strips to obtain sufficient viable cells to perform ovarian residual disease with a robust sensitivity of 10^{-4} in ovarian cell suspension [24] as in blood or bone marrow [37]. However, the application of this dissociation technique to a larger number of ovarian tissues from patients undergoing OTC should allow to corroborate of this trend.

In the last part of this work, the laboratory protocol and the commercial kit were compared. A higher cell viability was observed using the commercial kit: this result is reflected by the reduction of cell debris observed by MFC after ovarian tissue dissociation. The tissue dissociation may be less traumatic for ovarian cells when using the commercial protocol. This MFC result was confirmed by assessing cell viability using fluorescent microscopy: less debris was observed after dissociation. And viable isolated ovarian follicles were identified after dissociation. Both dissociation protocols can be potentially used to isolate, in non-optimal conditions, primordial/primary ovarian follicles instead of the technique previously published for assessment of isolated follicle viability by trypan blue [26].

As described by our team, MFC analysis of the ovarian tissue-dissociated cells can identify malignant cells among viable ovarian cells [23–25]. Ovarian tissue-dissociated cells have the advantage of being analyzable by MFC and RT-qPCR using the same original sample [23]. In the frame of human ovarian tissue qualification, ovarian tissue dissociation and MFC can also be used together to identify ovarian cell subpopulations like CD34 or CD31-positive

cells. These cells have been detected by immunohistochemistry and seem to be good predictors for neovascularization after ovarian tissue autotransplantation [38, 39]. Non-follicular ovarian cells might be assessed as a potential prognostic factor of ovarian function recovery in case of cryopreserved ovarian cortex re-use.

Conclusions

The dissociation protocols proposed in this study are essential to obtain an ovarian cell suspension before MFC analysis. The commercial kit improves viability after dissociation, is easy to use and facilitates MFC analysis of ovarian cell suspensions. MFC appears to be a good mean for minimal residual disease research and human ovarian tissue qualification before autograft. From our point of view, a controlled dissociation protocol associated to MFC is a promising tool for ovarian tissue qualification and minimal residual detection in human ovarian cortex.

Abbreviations

EthD-1: Ethidium homodimer-1; FSC: Forward light scatter; MFC: Multicolor flow cytometry; OTC: Ovarian tissue cryopreservation; PCOS: Polycystic ovary syndrome; RPMI: Roswell park memorial institute medium; RT-qPCR: Real-time quantitative polymerase chain reaction; SSC: Side light scatter

Acknowledgements

Not applicable.

Availability of data and materials

All data generated and analyzed during this study are included in the published article.

Funding

The study was supported by the BioMedicine Agency, the Besançon University Hospital, DGOS/INSERM/INCa and the regional Council of Franche-Comte. There were no conflicts of interest to declare.

Authors' contributions

TZ drafted the manuscript. CA and CR designed the study. TZ and EM conducted the biological experiments. AB performed surgery for ovarian tissue collection. CA and CR contributed to analysis of the data and to critical revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The use of human ovarian tissue for this study was approved by the Ethical Research Committee of Besançon University Hospital on 5 March 2013. All patients gave their written informed consent.

Author details

¹Centre Hospitalier Régional Universitaire Jean Minjot, Service de Biologie et Médecine de la Reproduction - Cryobiologie, CECOS Franche-Comté Bourgogne, CIC-1431, 3 boulevard Fleming, F-25030 Besançon Cedex, France. ²INSERM UMR 1098, 8 rue du Docteur Jean-François-Xavier Girod, BP1937, F-25020 Besançon Cedex, France. ³Université de Franche-Comté, 1 rue Goudimel, F-25030 Besançon Cedex, France. ⁴Centre Hospitalier Régional Universitaire Jean Minjot, Service de Gynécologie-obstétrique, 3 boulevard Fleming, F-25030 Besançon Cedex, France.

Received: 31 March 2017 Accepted: 9 June 2017

Published online: 23 June 2017

References

- Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCARE-5—a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):35–47.
- Baili P, Di Salvo F, Marcos-Gragera R, Siesling S, Mallone S, Santaquilani M, et al. Age and case mix-standardised survival for all cancer patients in Europe 1999-2007: results of EUROCARE-5, a population-based study. *Eur J Cancer*. 2015; doi:10.1016/j.ejca.2015.07.025.
- Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(12):735–49.
- Salama M, Mallmann P. Emergency fertility preservation for female patients with cancer: clinical perspectives. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3117–27.
- Hourvitz A, Yerushalmi GM, Maman E, Raanani H, Elizur S, Brengauz M, et al. Combination of ovarian tissue harvesting and immature oocyte collection for fertility preservation increases preservation yield. *Reprod BioMed Online*. 2015;31(4):497–505.
- Abir R, Ben-Aharon I, Garor R, Yaniv I, Ash S, Stemmer SM, et al. Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy. *Hum Reprod*. 2016;31(4):750–62.
- Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;100(5):1214–23.
- Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013; 31(19):2500–10.
- Peccatori FA, Azim HA, Jr., Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, Kesic V, et al. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi160–70.
- Wallace WH, Kelsey TW, Anderson RA. Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: the role of ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril*. 2016;105(1):6–12.
- Donnez J, Dolmans MM, Diaz C, Pellicer A. Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1097–8.
- Salama M, Woodruff TK. New advances in ovarian autotransplantation to restore fertility in cancer patients. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(4):807–22.
- Meirow D, Ra'anani H, Shapira M, Brenghausen M, Derech Chaim S, Aviel-Ronen S, et al. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertil Steril*. 2016;106(2):467–74.
- Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(8):1167–70.
- Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet*. 2016; doi:10.1007/s10815-016-0843-9.
- Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, et al. Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril*. 2004;82(3):679–85.
- Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at –196 C. *Endocrinology*. 1999;140(1):462–71.
- Aubard Y, Piver P, Cogni Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod*. 1999;14(8):2149–54.
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update*. 2009;15(6): 649–65.
- Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril*. 2013;99(6):1514–22.
- Bastings L, Beerendonk CC, Westphal JR, Massuger LF, Kaal SE, van Leeuwen FE, et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in cancer survivors and the risk of reintroducing malignancy: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2013;19(5):483–506.
- Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(1):11–24.
- Amiot C, Angelot-Delettre F, Zver T, Alvergnas-Vieille M, Saas P, Garnache-Ottou F, et al. Minimal residual disease detection of leukemic cells in ovarian cortex by eight-color flow cytometry. *Hum Reprod*. 2013;28(8):2157–67.
- Zver T, Alvergnas-Vieille M, Garnache-Ottou F, Ferrand C, Roux C, Amiot C. Minimal residual disease detection in cryopreserved ovarian tissue by multicolor flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014; 99(12):e249–52.
- Zver T, Alvergnas-Vieille M, Garnache-Ottou F, Roux C, Amiot C. A new method for evaluating the risk of transferring leukemic cells with transplanted cryopreserved ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(8):1263–6.
- Fauque P, Ben Amor A, Joanne C, Agnani G, Bresson JL, Roux C. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. *Fertil Steril*. 2007;87(5):1200–7.
- Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrlisch PS, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil Steril*. 2010;93(7):2413 e15–9.
- Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986–2010.
- Dolmans MM, Michaux N, Camboni A, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, Nottola SA, et al. Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles. *Hum Reprod*. 2006;21(2):413–20.
- Vanacker J, Camboni A, Dath C, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J, et al. Enzymatic isolation of human primordial and primary ovarian follicles with Liberase DH: protocol for application in a clinical setting. *Fertil Steril*. 2011;96(2):379–83. e3
- Vanacker J, Luyckx V, Amorim C, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, et al. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? *Fertil Steril*. 2013;99(5):1363–1368.e2.
- Paulini F, Vilela JM, Chiti MC, Donnez J, Jadoul P, Dolmans MM, et al. Survival and growth of human preantral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicle isolation and short-term xenografting. *Reprod BioMed Online*. 2016;33(3):425–32.
- Yin H, Kristensen SG, Jiang H, Rasmussen A, Andersen CY. Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1531–9.
- Kristensen SG, Rasmussen A, Byskov AG, Andersen CY. Isolation of pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue. *Hum Reprod*. 2011;26(1):157–66.
- Sanfilippo S, Canis M, Romero S, Sion B, Dechelotte P, Pouly JL, et al. Quality and functionality of human ovarian tissue after cryopreservation using an original slow freezing procedure. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(1):25–34.
- Soares M, Sahrari K, Chiti MC, Amorim CA, Ambroise J, Donnez J, et al. The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: medulla or cortex, cryopreserved or fresh? *Hum Reprod*. 2015;30(7):1589–98.
- Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;129(3):347–57.
- Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, Sauer H, Todorov P, Tawadros S, et al. Re-vascularisation in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;149(1):63–7.
- Dath C, Dethy A, Van Langendonck A, Van Eyck AS, Amorim CA, Luyckx V, et al. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Hum Reprod*. 2011;26(6):1431–9.

Titre : Qualification biologique des greffons de tissu ovarien autoconservé. Contribution à la codification des techniques de réutilisation en cas de pathologie néoplasique.

Mots clés : Collagénase NB6, bonnes pratiques de fabrication, follicules ovariens isolés, purification, cellules leucémiques.

Résumé : La cryoconservation de cortex ovarien est la seule technique envisageable pour les patientes pré-pubères et les femmes dont la pathologie nécessite l'administration d'un traitement hautement gonadotoxique dont l'initiation ne peut être différée. L'autotransplantation est jusqu'à présent la seule méthode disponible de réutilisation du tissu ovarien cryoconservé, et a permis d'obtenir plus de 130 naissances dans le monde, dont trois au CHRU de Besançon. Toutefois, en cas de pathologie néoplasique à risque de localisation métastatique ovarienne, cette technique peut présenter un risque de réintroduction de cellules malignes susceptibles d'être présentes dans le greffon. Des méthodes alternatives à l'autogreffe de tissu ovarien cryopréservé fondées sur l'utilisation de follicules ovariens isolés sont actuellement en développement. L'objectif de cette thèse a été de développer un protocole permettant l'isolement et la qualification de follicules ovariens qui pourront être utilisés en thérapie cellulaire à usage humain. Dans un premier temps, une validation de la technique d'isolement de follicules ovariens a été réalisée à partir de la dissociation de fragments de cortex ovarien, issus de patientes ayant subi une résection percoelioscopique, à l'aide d'une collagénase NB6 produite selon les bonnes pratiques

de fabrication. Les follicules ainsi obtenus ont été analysés en termes de viabilité (immédiate et après culture *in vitro*), rendement, morphologie et état prolifératif. Dans un deuxième temps, la sécurité carcinologique des suspensions folliculaires obtenues après isolement a été évaluée par cytométrie en flux multicolore à l'aide d'une modélisation ayant consisté en la contamination de suspensions folliculaires avec des cellules leucémiques issues de patients souffrant de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ou lymphoblastiques (LAL) d'immunophénotype connu. La collagénase NB6 a permis l'isolement d'un grand nombre de follicules vivants, principalement au stade primordial, et dont la majorité était non activée, même après trois jours de culture *in vitro* dans un gel de fibrine. La technique d'isolement suivie de trois lavages a permis d'éliminer les cellules leucémiques préalablement ajoutées aux suspensions folliculaires dans 23 cas sur 24, sans endommager les follicules isolés. La cytométrie en flux multicolore est une technique d'analyse efficace pour évaluer la contamination, par des cellules leucémiques, de suspensions contenant des follicules ovariens isolés. Le protocole d'isolement de follicules ovariens humains, ayant été réalisé avec la collagénase NB6 de grade clinique, peut être envisagé pour une reconstruction ovarienne à visée thérapeutique humaine.

Title : Biological qualification of cryopreserved ovarian tissue grafts. Contribution to the codification of re-use techniques in cases of neoplastic disease.

Keywords : Collagenase NB6, good manufacturing practices, isolated ovarian follicles, purification, leukemic cells.

Abstract: The cryopreservation of ovarian cortex is the only technique available for prepubertal girls and women when their pathology requires the administration of a highly gonadotoxic treatment whose initiation cannot be delayed. Autotransplantation has so far been the only available method to re-use cryopreserved ovarian tissue, and has resulted in more than 130 births worldwide, including three at the Besançon Hospital. However, in cases of neoplastic disease with a risk of ovarian metastatic localization, this technique may present a risk of reintroducing malignant cells likely to be present in the graft. Alternative methods to cryopreserved ovarian tissue autograft based on the use of isolated ovarian follicles are currently under development. The aim of this thesis was to develop a protocol allowing the isolation and the qualification of ovarian follicles that can be used in cell therapy for human purposes. In a first step, a validation of the technique to isolate ovarian follicles was carried out from the dissociation of cortical ovarian fragments, taken from patients undergoing a laparoscopic ovarian drilling, using collagenase NB6 which is produced according to good manufacturing practices.

Follicles thus obtained were analyzed in terms of viability (before and after *in vitro* culture), yield, morphology and proliferative state. In a second step, the carcinologic safety of follicular suspensions obtained after isolation was evaluated by multicolor flow cytometry using a model involving the contamination of follicular suspensions with leukemic cells from patients suffering from acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoblastic leukemia (LAL) with known immunophenotype. Collagenase NB6 has allowed the isolation of a large number of viable follicles, mostly at the primordial stage and the majority of which were unactivated even after three days of *in vitro* culture in a fibrin matrix. Our isolation technique followed by three washes has allowed the elimination of leukemic cells previously added to follicular suspensions, in 23 out of 24 cases, without damaging isolated follicles. Multicolor flow cytometry is an effective analytical technique for assessing leukemic cell contamination of suspensions containing isolated ovarian follicles. The protocol to isolate human ovarian follicles, performed with the clinical grade collagenase NB6, may be considered for an ovarian reconstruction to human therapeutic purposes.